



HAL
open science

Développement de radiotraceurs de la neuroinflammation pour l'imagerie des pathologies neurodégénératives

Fabien Chauveau

► **To cite this version:**

Fabien Chauveau. Développement de radiotraceurs de la neuroinflammation pour l'imagerie des pathologies neurodégénératives. Imagerie. Univ Paris 5, 2007. Français. NNT: . tel-03622503

HAL Id: tel-03622503

<https://hal.science/tel-03622503>

Submitted on 29 Mar 2022

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

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

UNIVERSITÉ PARIS 5

FACULTÉ DE PHARMACIE

ÉCOLE DOCTORALE DU MÉDICAMENT

ANNÉE : 2007

n° 07-614

THESE

Présentée

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5

par

M. Fabien CHAUVEAU

**Développement de radiotraceurs de la
neuroinflammation pour l'imagerie des
pathologies neurodégénératives**

Soutenue le 22 octobre 2007

JURY :

Pr Christiane Garbay

Dr Sabina Pappata

Dr Anna Planas

Dr Michel Mallat

Dr Jesus Benavides

Dr Hervé Boutin

Pr Bertrand Tavitian

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

*Moi mon souvenir le plus sincère
Se trouve au fond d'une mélodie
Que jouait un type un peu solitaire
Et qui s'en est allé depuis*

*Je vois l'image encore entière
De quand nous étions réunis
Tu voulais voir d'autres lumières
Et j'en avais envie aussi*

W. Sheller

*Ce manuscrit rassemble les résultats obtenus lors de ma thèse effectuée au Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Expérimentale (CEA SHFJ & Inserm U 803) entre octobre 2003 et octobre 2007. J'adresse mes plus chaleureux remerciements aux membres du jury, **Mmes Sabina Pappata et Anna Planas, Mme Christiane Garbay, MM. Michel Mallat et Jesus Benavides**, qui ont accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie **Bertrand Tavitian** de m'avoir accueilli dans son laboratoire (et converti à l'imagerie moléculaire !). Son engagement dans les différents réseaux européens a été particulièrement précieux pour ma formation tout au long de ma thèse.*

***Hervé Boutin** doit être remercié à plusieurs titres : pour avoir rédigé la proposition de thèse qui m'a attiré dans ce guet-apens, pour avoir initié durant son post-doc le travail sur les ligands du PBR et m'y avoir associé, pour avoir ensuite, malgré la distance, continué de suivre l'avancement du travail.*

*Celui-ci n'a pas été solitaire, et doit énormément à de nombreuses personnes : tout d'abord, les équipes de radiochimie et d'instrumentation du SHFJ, ensuite, les équipes de **Michael Kassiou et d'Andrew Katsifis**, enfin, **Sanofi-Aventis** et notamment **Marie-Noëlle Castel et Dominique Briet**, qui ont travaillé avec Hervé. Je remercie Jesus Benavides pour m'avoir permis de présenter les résultats concernant la molécule SSR180575 et donné accès au modèle murin de la maladie d'Alzheimer.*

*Plus particulièrement, de grands mercis à **Frédéric Dollé** pour son implication et soutien permanents à ce travail, aux radiochimistes **Cyrille Thominiaux, Françoise Hinnen, Bertrand Kühnast**, et aux **Stéphanes, Demphel et Le Heillex**, sans oublier **Annelaure Damont, Yann Bramouille** et l'équipe des cyclotronistes. Côté « instrum' », la bonne humeur (et un zeste de magie) a toujours été de rigueur au microPET grâce à **Vincent et Yoan**, et **Régine Trebossen** a toujours été disponible en cas de besoin. Les échanges ont été plus « sportifs » avec **Florent**, plus « paternalistiques » avec **Sébastien** : je conseille donc au premier de se limer les coudes, au second de faire gaffe au complexe d'Electre.*

*Merci et bonne chance à **Nadja** : cette dernière année n'aurait pas été aussi riche sans ta présence.*

***Frédéric Ducongé** m'a orienté dans la jungle « patamérienne », sans grand succès, mais tu le sais Fred, sans rancune. Simplement, fais moi plaisir, n'attends pas que le CSP remonte en ProA pour relancer un Selex VCAM ! **Carine** a été une grande soeur prévenante pour l'apprentissage des techniques de bio mol et pour celui des formalités universitaires. **Domenico Libri et Youssef** m'ont passé le flambeau. Merci !*

*Un salut au cercle des piqueurs de souris (**Karine, Benoît, et Raphaël**), et à celui de la cahuète de 20h (**Thomas, Stéphanie...** et moi !). Enfin, un grand MERCI à tous les membres passés (**Véro, Nassima, Aurélie, Mathieu, Nicolas, Julie...**) et présents (**Bahija, Catherine, Irina, Pierre-Adrien, Simone, Karine, Stéphanie, Laurence, Elina, Laïla, Benoît, Emilie, Agnès, Renaud, Fabien, Isabelle**) du laboratoire pour ces années particulièrement agréables. Bonne chance à **Anikitos, Galith et Alexandra...***

J'ajoute une pensée pour ma famille et ma belle-famille.

*Et pour tout le reste, c'est-à-dire l'essentiel, merci à **Magali, Flora, Colette et Alma** !*

LISTE DES ABBREVIATIONS

| | |
|-----------------|--|
| 2'F-Py : | 2' fluoro-pyrimidine |
| ADN : | acide déoxyribonucléique |
| AMPA : | acide (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionique |
| ARN : | acide ribonucléique |
| ATP : | adénosine tri-phosphate |
| AVC : | accident vasculaire cérébral |
| BHE : | barrière hémato-encéphalique |
| BP : | potentiel de liaison |
| CAM : | molécule d'adhésion cellulaire |
| CMH : | complexe majeur d'histocompatibilité |
| COX : | cyclooxygénase |
| CPA : | cellule présentatrice de l'antigène |
| DWI : | diffusion-weighted imaging |
| EAE : | encéphalite auto-immune expérimentale |
| FDG : | fluoro-2déoxy-D-glucose |
| FRO : | formes réactives de l'oxygène (= ROS : <i>reactive oxygene species</i>) |
| IFN : | interféron |
| IgSF : | <i>immunoglobulin-like superfamily</i> |
| IL : | interleukine |
| IRM : | imagerie par résonance magnétique |
| LCR : | liquide céphalo-rachidien |
| LPS : | lipopolysaccharide |
| NO : | oxyde nitrique |
| NOS : | oxyde nitrique synthase |
| MMP : | <i>matrix-metalloproteinase</i> |
| PBR : | récepteur périphérique aux benzodiazepines (=TSPO) |
| PEG : | polyéthylène glycol |
| PWI : | perfusion-weighted imaging |
| ROI : | région d'intérêt |
| SELEX : | évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel |
| SNC : | système nerveux central |
| TEP : | tomographie d'émission de positons |
| TEMP : | tomographie d'émission mono-photonique |
| TLR : | <i>toll-like receptor</i> |
| TNF- α : | <i>tumor necrosis factor</i> |
| TSPO : | <i>translocator protein</i> (=PBR) |
| VEGF : | <i>vascular endothelial growth factor</i> |

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 9 |
| A) NEUROINFLAMMATION | 11 |
| 1) Définitions, mécanismes cellulaires et moléculaires..... | 11 |
| 1-1) La réaction inflammatoire et l'immunité : généralités..... | 11 |
| 1-1-1) Acteurs et médiateurs de l'inflammation..... | 12 |
| 1-1-2) Inflammation et immunité..... | 14 |
| 1-1-3) Modèle multi-étapes de la transmigration leucocytaire..... | 16 |
| 1-2) Activation endothéliale et molécules d'adhésion..... | 17 |
| <i>Roulement</i> | 18 |
| <i>Adhésion ferme</i> | 19 |
| <i>Diapédèse</i> | 20 |
| 1-3) Cas du système nerveux central (SNC)..... | 23 |
| 1-4) Immunité cérébrale innée..... | 25 |
| <i>Cellules résidentes</i> | 25 |
| <i>Gliose et activation microgliale</i> | 27 |
| 1-5) Dualité de la réponse inflammatoire..... | 30 |
| 2) Le récepteur périphérique aux benzodiazepines et l'imagerie de la neuroinflammation..... | 34 |
| 2-1) Le récepteur périphérique aux benzodiazepines (PBR) et ses ligands..... | 34 |
| 2-2) Tomographie d'émission de positons..... | 38 |
| 2-3) Imagerie de la neuroinflammation..... | 43 |
| <i>Imagerie TEP de la neuroinflammation avec le [¹¹C]-(<i>R</i>)-PK11195</i> | 43 |
| <i>Autres radioligands et modalités d'imagerie non invasive pour l'inflammation</i> | 44 |
| 3) Neuropathologies et neuroinflammation..... | 46 |
| 3-1) Maladie d'alzheimer..... | 46 |
| 3-2) Maladie de Parkinson..... | 49 |
| 3-3) Maladie de Huntington..... | 51 |

| | |
|--|-----|
| 3-4) Accident vasculaire cérébral ischémique..... | 52 |
| 3-5) Sclérose en plaques..... | 53 |
| 3-6) Autres neuropathologies..... | 56 |
| 4) Présentations des deux approches explorées..... | 57 |
| 4-1) Limitations des études utilisant le [¹¹ C]PK11195..... | 57 |
| 4-2) Imagerie TEP de la neuroinflammation grâce aux radioligands du PBR..... | 59 |
| 4-3) Autres cibles d'intérêt pour l'imagerie de la neuroinflammation..... | 77 |
| <i>Choix d'une cible endothéliale</i> | 77 |
| <i>Sélectine ou molécule d'adhésion cellulaire ?</i> | 77 |
| <i>ICAM-1 ou VCAM-1 ?</i> | 78 |
| 4-4) Sélection d'aptamères pour l'imagerie de l'inflammation..... | 80 |
| 4-4-1) Présentation des aptamères et de leurs applications..... | 80 |
| 4-4-2) Aptamères et inflammation..... | 89 |
| 4-4-3) Imagerie TEP des aptamères : avantages potentiels pour l'imagerie de VCAM-1..... | 90 |
| <i>Bibliographie du chapitre A</i> | 92 |
| B) APTAMERE ANTI-VCAM-1 | 115 |
| 1) Résultats..... | 115 |
| 1-1) Sélection d'un aptamère contre le fragment N-terminal de VCAM-1..... | 115 |
| 1-2) Données supplémentaires..... | 129 |
| 1-2-1) Caractérisation de la liaison à VCAM-1 native..... | 129 |
| 1-2-2) Spécificité de l'aptamère 12.11..... | 134 |
| 1-2-3) Sélection combinée sur cellules et protéine (« cross-over SELEX »)..... | 137 |
| 2) Discussion sur la sélection d'un aptamère anti-VCAM-1..... | 144 |
| <i>Aspects méthodologiques</i> | 144 |
| <i>Choix de la cible</i> | 145 |
| <i>Bibliographie du chapitre B</i> | 148 |

| | |
|--|----------------|
| C) RADIOLIGANDS DU RECEPTEUR PERIPHERIQUE AUX BENZODIAZEPINES..... | 151 |
| <i>Caractéristiques physicochimiques des radioligands évalués.....</i> | <i>151</i> |
| 1) Modèle de neuroinflammation aiguë..... | 152 |
| 1-1) Caractérisation..... | 153 |
| 1-2) Comparaison des radiotraceurs testés..... | 158 |
| 1-2-1) Autoradiographie..... | 158 |
| 1-2-2) Imagerie TEP..... | 161 |
| <i>Résumé.....</i> | <i>195</i> |
| <i>Données additionnelles.....</i> | <i>196</i> |
| 2) Modèle de neuroinflammation chronique..... | 201 |
| 2-1) Description..... | 201 |
| 2-2) Résultats préliminaires..... | 203 |
| <i>Résumé.....</i> | <i>211</i> |
| <i>Données additionnelles.....</i> | <i>212</i> |
| 3) Discussion sur l'évaluation préclinique de radioligands du récepteur périphérique aux benzodiazepines..... | 214 |
| <i>Modèle de neuroinflammation aiguë.....</i> | <i>214</i> |
| <i>Modèle de neuroinflammation chronique.....</i> | <i>219</i> |
| <i>Conclusion.....</i> | <i>220</i> |
| <i>Bibliographie de la partie C.....</i> | <i>221</i> |
| CONCLUSION..... | 225 |
| MATERIEL&METHODES..... | 227 |

INTRODUCTION

Le vieillissement de la population des pays occidentaux s'accompagne d'une incidence croissante des neuropathologies. Les pertes neuronales associées sont soudaines, comme dans le cas d'un accident vasculaire cérébral, ou progressives, lors d'une maladie neurodégénérative. Dans le premier cas, un traitement d'urgence peut agir sur la cause (obstruction d'une artère), mais il n'existe pas aujourd'hui de traitement capable d'améliorer la récupération fonctionnelle. Dans le second cas, les traitements disponibles agissent sur certains symptômes, mais aucun ne ralentit durablement la progression de la maladie. En l'absence de thérapie cellulaire de remplacement, l'enjeu actuel est donc de limiter l'extension des dégâts neuronaux par une prise en charge précoce.

Dans un cas, les mécanismes physiopathologiques évoluent très rapidement, à l'échelle de l'heure. Dans l'autre, l'évolution est au contraire très lente, à l'échelle de plusieurs années. Ces différences radicales ont pourtant une conséquence commune, qui est la forte hétérogénéité physiopathologique présentée par une population donnée de patients. Ceci est une raison fréquemment avancée pour expliquer la difficulté de l'évaluation d'une nouvelle thérapie et les nombreux échecs essuyés.

Détecter précocément pour agir au plus tôt, et recruter de façon fiable les patients susceptibles de bénéficier d'une nouvelle thérapie, repose sur la définition et l'usage de biomarqueurs. Un biomarqueur est une quantité mesurable ou un aspect défini objectivement dont la valeur ou le statut reflète fidèlement l'évolution de la maladie. Dans le cas des neuropathologies, les marqueurs sanguins sont peu spécifiques, et l'analyse du liquide céphalo-rachidien est un sujet difficile, dont les résultats sont controversés. Surtout, les marqueurs solubles ne fournissent aucune information spatiale, et leur résolution temporelle est mal définie. La neuroimagerie est susceptible de fournir des biomarqueurs de sensibilité et spécificité supérieures aux tests cognitifs et moteurs. L'objet de ce travail, qui concerne le développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie par tomographie d'émission de positons de la neuroinflammation, participe de cette recherche de biomarqueurs potentiels. La composante inflammatoire des neuropathologies a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, ce qui suggère un large spectre d'application pour une méthode d'imagerie capable de rendre compte de la dynamique neuroinflammatoire.

Le **chapitre A** fait le point sur les composantes et le statut de la neuroinflammation, présente les méthodes d'imagerie disponibles, et examine leur performance. Les deux approches complémentaires envisagées pour le développement de radiotraceurs sont justifiées à la fin de ce chapitre.

Le **chapitre B** expose et discute les résultats du développement d'un ligand aptamère.

Le **chapitre C** présente l'évaluation de plusieurs radiotraceurs dans des modèles animaux de neuroinflammation.

A) NEUROINFLAMMATION

1) Définitions, mécanismes cellulaires et moléculaires

1-1) La réaction inflammatoire et l'immunité : généralités

L'inflammation est un processus réactif à une perturbation d'origine pathologique ou traumatique : pénétration d'un agent infectieux, d'un antigène, blessure. Sa raison d'être est l'isolement du tissu agressé et l'élimination des agents agresseurs éventuels. Elle est donc un élément primordial de l'immunité non spécifique ou innée, en même temps qu'un facteur initiateur et régulateur de la réponse immunitaire spécifique ou adaptative. Historiquement, l'inflammation a été identifiée par la tétrade de Celsius : douleur (dolor), chaleur (calor), rougeur ou érythème (rubor), gonflement ou œdème (tumor), aboutissant à la formation d'une cicatrice.

Physiologiquement, l'apparition de cette tétrade signale en fait l'entrée dans une phase secondaire, systémique, au cours de laquelle la supplémentation vasculaire est essentielle. La phase primaire, de déclenchement, est uniquement tissulaire, et met en jeu la réactivité cellulaire à divers stimuli agressifs. La phase secondaire consiste en une cascade de réactions microvasculaires et cellulaires permettant d'éliminer le tissu endommagé et de promouvoir la régénération de celui-ci. Cette cascade est pré-programmée et stéréotypique, et l'ensemble des tissus a la capacité de l'exécuter. Elle met successivement en jeu une vasoconstriction réflexe, qui permet l'activation des plaquettes, puis une vasodilatation des artérioles et des vénules avec augmentation du débit microcirculatoire, causant chaleur et rougeur, suivi dans bien des cas par une stase et une thrombose. La perméabilité des vaisseaux est augmentée, permettant la fuite de plasma et de cellules dans le tissu, ce qui induit l'œdème (par distension des tissus) et la douleur (par compression sur les terminaisons nerveuses). L'altération des parois vasculaires permet ensuite l'invasion du tissu par les cellules immunitaires circulantes, la dégradation de celui-ci par protéolyse et formation de radicaux libres, nécrose et apoptose, sa « digestion » par les cellules phagocytaires, puis l'expression de facteurs humoraux déclenchant la prolifération cellulaire, et la genèse d'un nouveau tissu fonctionnel.

Cette dernière étape est associée à la résolution de l'inflammation, qui sinon, devient chronique, et de fait néfaste pour l'organisme au lieu de lui être bénéfique. Toute réaction inflammatoire est accompagnée par une mort cellulaire nécrotique et apoptotique, affectant l'endothélium, le tissu parenchymateux, et les cellules immunitaires infiltrées. Au contraire, la résolution de l'inflammation est associée à des processus d'angiogenèse, premier pas vers la régénération tissulaire.

Schématiquement, l'inflammation aiguë comprend donc une phase de déclenchement tissulaire, immédiate ou presque, et une phase systémique qui se décompose elle-même en 3 phases de durée croissante : une phase vasculaire de quelques minutes, une phase cellulaire de quelques heures, et une phase résolutive de quelques jours (fig. 1). L'inflammation chronique

est quant à elle caractérisée par une durée prolongée durant laquelle se côtoient simultanément des processus inflammatoires, des dommages tissulaires et des tentatives de régénération.

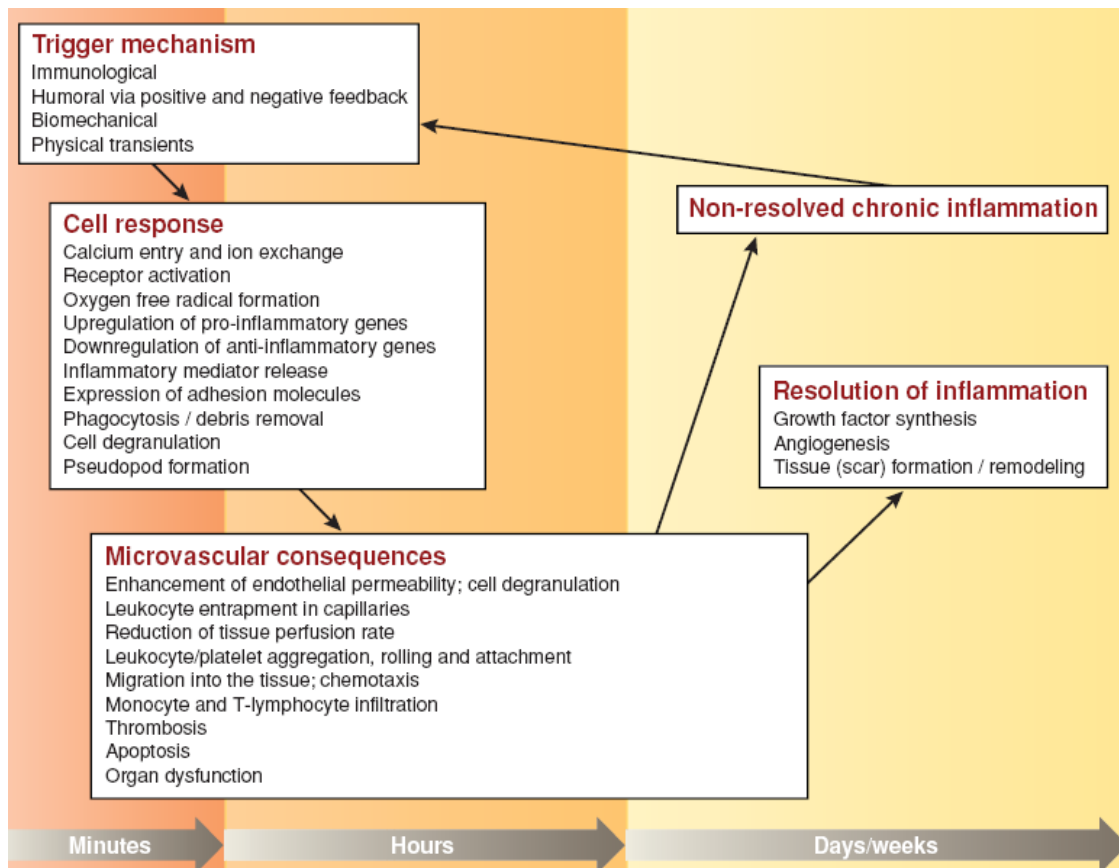


Figure 1. Distribution temporelle des étapes essentielles de la cascade inflammatoire, extraite de Schmid-Schonbein, 2006(1).

L'immunité innée est un système de réponse immédiat, générique, aux agents pathogènes, dont des motifs caractéristiques sont reconnus. L'inflammation, comme composante de l'immunité innée, a longtemps été associée aux infections, et son étude a d'abord reposé sur l'analyse d'échantillons de sang, d'urine ou de lymphe. Cela implique que l'inflammation ait atteint un stade avancé, où les marqueurs circulants deviennent globalement détectables.

L'immunité adaptative (ou acquise) est un système de réponse spécifique à une menace extérieure, qui suppose plasticité et mémoire, pour la reconnaissance d'antigènes donnés. Cela requiert la migration des cellules immunitaires des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse, thymus), où elles sont produites, vers les organes et tissus lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, ...), où se produit leur activation et différenciation, puis, de manière concomitante à la réaction inflammatoire, vers le tissu lymphoïde tertiaire (lieu de l'inflammation) (2).

1-1-1) Acteurs et médiateurs de l'inflammation

Plusieurs types cellulaires (les acteurs) et un grand nombre de facteurs signalisant (les médiateurs) interviennent au cours de la cascade inflammatoire.

Acteurs

L'essentiel des réponses immunitaires est dû à l'action des leucocytes. Un premier groupe important de leucocytes est formé par les cellules phagocytaires : phagocytes mononucléés, et polynucléaires neutrophiles (ou granulocytes). Représentant la première ligne de défense contre l'infection, avec les lymphocytes NK, l'action de ce groupe est associée à l'immunité innée, donc à inflammation, tandis que le second groupe, formé des lymphocytes des classes T et B, est à l'origine des réponses immunitaires adaptatives. L'articulation entre immunité innée et adaptative est réalisée au travers des interactions entre cellules phagocytaires et lymphocytaires, notamment par la présentation de l'antigène.

Médiateurs

Les systèmes de la coagulation et du complément interviennent dès l'initiation de la réaction inflammatoire. On distingue ensuite :

- des médiateurs préformés, les plus importants étant l'histamine, la sérotonine, et les kinines, qui agissent sur la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme;
- des médiateurs d'origine membranaire, notamment toutes les prostaglandines synthétisées à partir de l'acide arachidonique (via les enzymes cyclooxygénases (COX)), PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, qui sont libérés sous l'action de la phospholipase A2 et ont un effet vasodilatateur important ;
- des médiateurs d'origine cytoplasmique, qui comprennent en particulier les enzymes produisant les radicaux libres (Nitric Oxyde Synthases (NOS), NADPH oxidase, peroxydases).

L'explosion oxydative est une arme anti-bactérienne essentielle des neutrophiles, qui consiste en la production très rapide de formes réactives de l'oxygène (FRO ou acronyme anglais ROS) : radical anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), radical hydroxyle (OH^{\cdot}). L'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) est également un vasodilatateur puissant, et réagit avec H_2O_2 pour former le radical anion peroxydite ($ONO_2^{\cdot-}$), particulièrement oxydant.

Les cytokines constituent une classe centrale de polypeptides pour la communication intercellulaire. Elles sont en général produites de manière transitoire, ont une action autocrine, paracrine et endocrine, des effets pléiotropiques et parfois redondants, et jouent un rôle prépondérant dans la régulation des fonctions des cellules phagocytaires (adhérence, déplacement orienté, phagocytose, activation des systèmes lytiques...) : l'interleukine-1 (IL-1), le *tumor necrosis factor* (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6) figurent parmi les cytokines dites pro-inflammatoires les plus importantes, aux multiples effets locaux (activation cellulaire lors du déclenchement de l'inflammation, mais aussi facteur angiogénique ou apoptotique lors de sa résolution) et systémiques (induction de fièvre, sécrétion des protéines de la phase aigue, activation de la coagulation). IL-10, G-CSF exercent un certain nombre d'effets contraires et sont considérées comme des cytokines anti-inflammatoires.

Ces molécules agissent en réseau, selon une cascade de phénomènes synergiques, activateurs ou inhibiteurs très finement régulés. Il existe de nombreuses façons de classer les cytokines (d'après leur structure, fonction, ou type de cellule productrice), et la nomenclature distingue en général six groupes (3) : les interleukines, les interférons, les cytokines cytotoxiques, les facteurs de croissance hématopoïétiques, les facteurs de croissance du groupe TGF et les chimiokines (ou cytokines chimiotractantes).

Ce dernier groupe constitue une famille de plus de 40 polypeptides qui interviennent essentiellement en attirant les leucocytes. Les polynucléaires neutrophiles sont notamment attirés par l'IL-8, les monocytes par MCP-1, et les lymphocytes par IP-10. L'action coordonnée des chimiokines et des autres cytokines permet notamment l'extravasation des leucocytes. Le profil local de sécrétion est donc directement responsable de la nature cellulaire de l'infiltration inflammatoire et la magnitude de la réaction immunitaire innée est largement déterminée l'activité cytokinique.

Enfin, un grand nombre de protéines, dites de la phase aiguë de l'inflammation (4), produites à distance du site inflammatoire, constitue des marqueurs génériques de l'inflammation, car leur concentration sanguine augmente de façon conséquente : les protéines SAA (*Serum Amyloid A*) et CRP (*C-reactive protein*), cette dernière étant l'indicateur clinique par excellence d'un état inflammatoire, sont libérées par les hépatocytes sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires. Un certain nombre de changements neuroendocriniens non-spécifiques sont également notés, comme la fièvre déjà mentionnée, la somnolence et l'anorexie. Schématiquement, ils résultent d'interaction entre les cytokines émanant du système immunitaire et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien producteur de glucocorticoides aux multiples actions anti-inflammatoires (5).

1-1-2) Inflammation et immunité

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Chez les mammifères, les récepteurs TLR (*Toll-Like Receptors*) des phagocytes mononucléés tissulaires reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, reconnu par TLR4, l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram positif, reconnu par TLR2 ou l'ARN double-brin, par TLR3. Des voies de signalisation communes sont alors mises en jeu, faisant intervenir les facteurs de transcription centraux NF- κ B et AP-1, qui induisent l'expression de la majorité des gènes de l'immunité innée. D'un autre côté, des gènes protecteurs ou anti-apoptiques exprimés constitutivement (hémoxigénase, A20, Bcl-2) protègent d'une activation chronique intempestive et promeuvent la survie du tissu en cas de forte réaction inflammatoire, comme lors d'un rejet de greffe (6). *In fine*, l'immunité innée permet une activité anti-microbienne (IFN- α et IFN- β , NO) et inflammatoire (IL-1, IL-6, TNF- α), conduisant à des réponses aiguës (fièvre, production des protéines de phase aiguë par le foie...).

La réponse inflammatoire ainsi initiée entre dans sa phase vasculaire, qu'identifie la tétrade de Celsius. Elle fait intervenir le système de la coagulation et celui du complément, qui participent au chimiotactisme envers les neutrophiles et les monocytes. La phase vasculaire débute en générale avec l'activation des plaquettes, qui ne migrent pas ou peu à travers l'endothélium et culmine avec l'arrivée des neutrophiles, parce qu'ils représentent la principale population leucocytaire circulante. L'activation cellulaire au sein de la microcirculation est caractérisée par la production de FRO (*ROS*). Cette production émane des cellules immunitaires et de l'endothélium, et a une fonction de signal intra- ou intercellulaire, ainsi que de destruction d'un agent pathogène reconnu par le système immunitaire (explosion oxydative). Le recrutement des neutrophiles s'effectue en l'espace de quelques heures, et ils sont capables d'une forte activité bactéricide, et phagocytaire. Les phagocytes mononucléés (monocytes, qui se différencieront en macrophages tissulaires ou en cellules dendritiques), et les lymphocytes s'accumulent plus progressivement, à l'échelle de quelques jours, au sein du tissu inflammé. *A contrario*, l'inflammation et les réactions auto-immunes chroniques sont

caractérisées par une présence prédominante de lymphocytes T et de phagocytes mononucléés, au détriment des neutrophiles.

Si les neutrophiles ont une faible durée de vie et meurent par apoptose sur le site inflammatoire, les lymphocytes et les cellules dendritiques recirculent par voie lymphatique du tissu aux organes lymphoïdes secondaires. La circulation ou drainage lymphatique s'établit grâce à la collecte des fluides interstitiels dérivés du plasma sanguin dans des vaisseaux lymphatiques disséminés dans les tissus. Avant le retour au sang par le canal thoracique, la lymphe traverse les ganglions lymphatiques dont les cellules endothéliales particulières appelées *HEV* (*High Endothelial Venules*) permettant la domiciliation ou *homing* des lymphocytes, et l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique.

Celle-ci suppose la détection d'épitopes spécifiques. Ils sont associés, sous la forme de fragments peptidiques, aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), et reconnus par les lymphocytes. Les molécules de classe I (CMH-I) présentent des peptides essentiellement issus de protéines cytosoliques qui sont reconnus par les lymphocytes T CD8, alors que les molécules de classe II (CMH-II) présentent des peptides dérivés de protéines extracellulaires par endocytose qui sont reconnus par les lymphocytes T CD4. Cette dichotomie entraîne deux types de réponses : l'élimination des cellules anormales ou infectées par les CD8 (cytotoxiques) et la lutte contre les antigènes extracellulaires par les CD4 (auxiliaires). Si les molécules du CMH-I sont exprimées par presque toutes les cellules nucléées de l'organisme, les molécules du CMH-II sont exprimées principalement par les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les monocytes/macrophages, et les cellules dendritiques et endothéliales. De plus, cette expression est inductible sur d'autres types cellulaires. Parmi les cellules présentant l'antigène (CPA), celles qui expriment des molécules CMH-I mais ne délivrent pas l'ensemble des signaux nécessaires à l'initiation d'une réponse immunitaire, sont dites « non professionnelles », et contribuent donc au maintien de la tolérance de l'organisme vis-à-vis de ces propres constituants. Celles qui délivrent l'ensemble des signaux de costimulation et de différenciation, via l'expression des CMH-I et II, et de molécules de costimulation (famille B7, CD40), ayant ainsi la capacité d'activer et de faire proliférer les lymphocytes T, sont dites « professionnelles » (fig. 2). Il s'agit en premier lieu des cellules de la lignée des monocytes-macrophages, dont sont dérivées les cellules dendritiques (résidentes-tissulaires et parfois circulantes-sanguines), puis des lymphocytes B, et certaines cellules épithéliales, endothéliales, ou fibroblastes, à l'expression de CMH-II inductible.

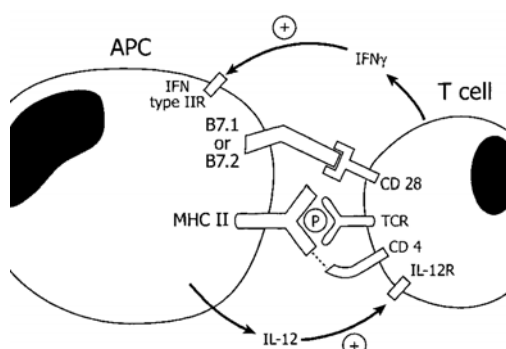


Figure 2. Signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T, adapté de Becher *et al.*, 2000 (7). L'antigène doit être présenté par une molécule CMH de classe II et un signal additionnel de co-stimulation par la liaison B7/CD28 est requis.

A l'issu de ce processus, une réponse immunitaire spécifique est engendrée, cellulaire via l'action des lymphocytes T, humorale via la production d'anticorps par les lymphocytes B. Un paradigme important relève du répertoire polarisé des cytokines et des récepteurs cytokiniques exprimés par les lymphocytes activés: les lymphocytes CD4⁺ T helper 1 (Th1) produisent typiquement des cytokines traditionnellement dites pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12), qui favorisent les réponses cellulaires cytotoxiques, tandis que les lymphocytes CD4⁺ T helper 2 (Th2) produisent des cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) parfois improprement nommées anti-inflammatoires, mais plutôt associées aux réactions allergiques et à la production d'anticorps IgE et IgA par les lymphocytes B. La dénomination Th1 ou 2 est fréquemment étendue au profil plus général de la réponse immunitaire qui en découle, même si cette dichotomie lymphocytaire fonctionnelle n'est pas la règle puisque des profils intermédiaires sont le plus souvent observés.

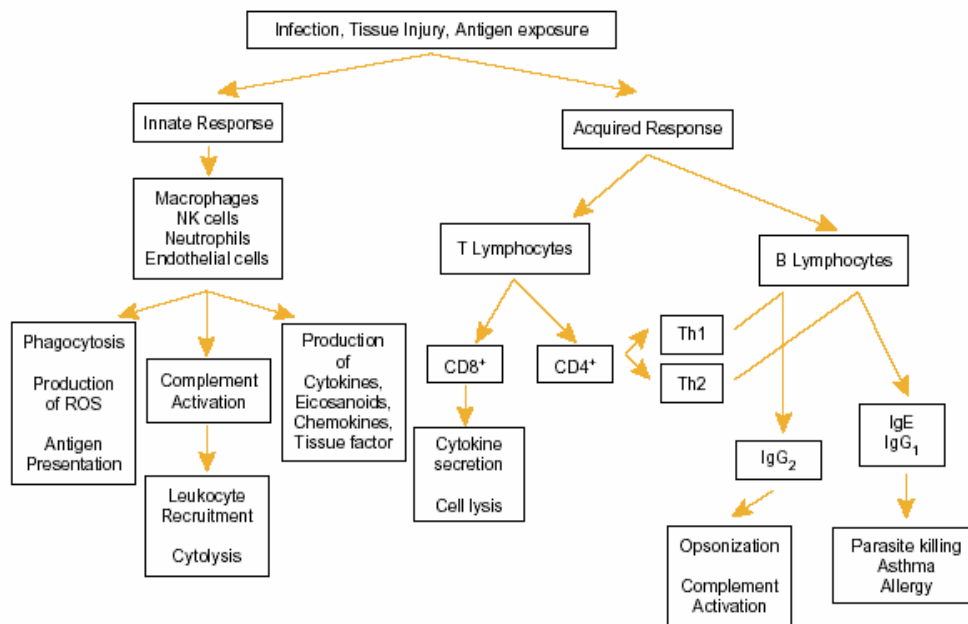


Figure 3. Vue d'ensemble de la réponse immunitaire, extraite de Sherwood, 2004 (8).

La multiplicité et l'efficacité des processus immunitaires (fig. 3) implique une surveillance active. La circulation antigénique, la recirculation lymphocytaire, et le renouvellement des cellules immunitaires résidentes, constituent donc une activité homéostatique normale, nécessaire à la mobilisation rapide des acteurs de l'immunité. De multiples modalités de migration cellulaire existent, réalisées normalement ou au cours d'une réaction immunitaire. Ces migrations s'effectuent sous la dépendance d'un grand nombre de facteurs, rattachés soit à l'état d'activation des leucocytes, soit à l'état d'activation de l'endothélium vasculaire, soit à la présence de molécules chimiotactiques. Ces trois groupes sont rassemblés au sein d'un paradigme décrivant l'adhésion leucocytaire sur une surface endothéliale selon un modèle en plusieurs étapes (fig. 4), parfois dit de Springer.

1-1-3) Modèle multi-étapes de la transmigration leucocytaire

La première étape implique la production locale de médiateurs activant l'endothélium adjacent au site inflammatoire. Il peut s'agir de l'histamine, la thrombine, ou d'une cytokine pro-inflammatoire (TNF- α , IL-1). Au niveau microvasculaire, l'inflammation provoque une stase et augmente la perméabilité endothéliale envers l'ensemble des composants du plasma,

des ions aux protéines. A un stade avancé, la fuite d'érythrocytes est possible. Les leucocytes, plus gros et moins déformables, se déplacent plus lentement, ce qui favorise leur contact aléatoire avec l'endothélium (margination), initiant ainsi leur roulement (*rolling*). Le roulement des leucocytes sur une surface endothéliale est observé seulement en condition de flux, car il résulte des forces de cisaillement appliquées sur une cellule et des interactions adhésives de faible affinité entre celle-ci et l'endothélium activé. L'étape suivante est caractérisée par l'activation du leucocyte, sous l'effet de cette première interaction et de molécules chimiotractantes produites localement. Celles-ci peuvent être spécifiques d'un type moléculaire d'interaction ou d'un sous-groupe de cellules immunitaire, ou bien agir de manière non-spécifique en induisant plusieurs protéines adhésives. L'adhésion est ainsi renforcée, et devient résistante au flux, provoquant l'arrêt complet de la cellule (adhésion ferme). La dernière étape consiste en la migration de la cellule à travers l'endothélium (transmigration ou diapédèse).

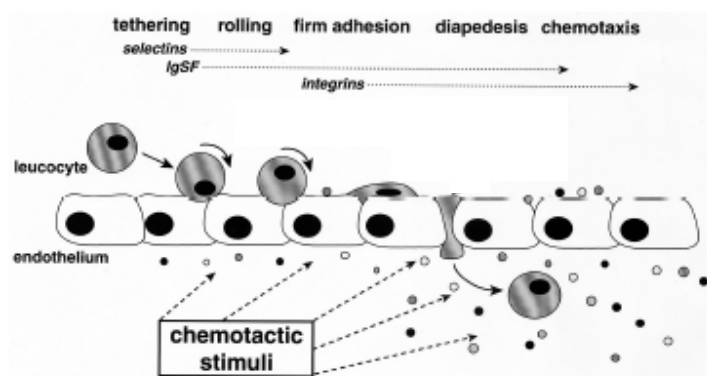


Figure 4. Modèle multi-étapes de la migration cellulaire vers un foyer inflammatoire, modifiée d'après Carter et Wicks, 2001(9).

De manière schématique, la régulation est quantitative pour les protéines exprimées par l'endothélium (changement de l'expression membranaire), et plutôt qualitative pour celles des cellules immunitaires (changement de l'affinité envers le contre-récepteur).

1-2) Activation endothéliale et molécules d'adhésion

Cette partie consiste en un examen des couples membranaires récepteur/contre-récepteur les plus importants du modèle multi-étapes (10, 11). Les recherches sur ce sujet ont culminées au début des années 90 (12), avec des résultats obtenus essentiellement sur cultures cellulaires ou chez l'animal, grâce à la production et l'emploi d'anticorps ou de protéines recombinantes solubles (13, 14). Puis, de nombreuses données ont été obtenues via la génèse de souris transgéniques (15). Il est important de réaliser que les couples présentés ci-dessous ne sont pas exclusifs : les récepteurs ont en général une affinité non négligeable pour plusieurs ligands, et les interactions prédominantes dépendent largement du micro-environnement (16).

Roulement

En conditions inflammatoires, une interaction spécifique des leucocytes avec les cellules endothéliales s'établit durant le roulement via les sélectines :

| ENDOTHELIUM | LEUCOCYTE |
|--|---|
| sélectine P = GMP-140 (<i>Granule Membrane Protein-140</i>) = CD62P | PSLG-1 (<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>) = CLA (<i>Cutaneous Leukocyte Antigen</i>) Sialyl Lewis X (SLe ^x) = CD15s |
| sélectine E = ELAM-1 (<i>endothelial-leukocyte adhesion molecule-1</i>) = CD62E | Sialyl Lewis X (SLe ^x) = CD15s ESL-1 (<i>E-Selectin Ligand-1</i>), PSLG-1 |
| GlyCAM-1 (<i>Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1</i>) = Sgp50 Sgp90 = CD34 MadCAM-1 (<i>Mucosomal addressin-Cell Adhesion Molecule-1</i>) Sialyl Lewis X (SLe ^x) = CD15s | sélectine L = LECAM-1 (<i>leukocyte-endothelial cell adhesion molecule-1</i>) = CD62L |

Les sélectines (CD62) P(laquettaire), E(ndothéliale) et L(eucocytaire) représentent un sous-groupe des lectines, dont l'activité de liaison du domaine amino-terminal est de type C, soit calcium dépendant. La partie extracellulaire des sélectines comprend ensuite des répétitions du domaine EGF (*Epidermal Growth Factor*), puis un nombre variable de domaines de type CR (*complement regulatory*).

La sélectine P est exprimée constitutivement et stockée dans les granules des plaquettes et des cellules endothéliales. L'expression membranaire est déclenchée par l'activation de la cellule endothéliale sous l'effet de divers facteurs (thrombine, histamine, FRO (*ROS*)). Une expression très rapide et transitoire a été décrite. Au contraire, l'expression de la sélectine E, régulée par les cytokines médiatrices de l'inflammation, est plus lente mais plus durable. La sélectine L a une expression membranaire constitutive, mais la partie extracellulaire est coupée lors de l'activation leucocytaire, et une modulation de l'affinité envers le ligand carbohydre Sialyl Lewis X a été décrite (17). Elle est un récepteur important pour la domiciliation lymphocytaire dans les ganglions lymphatiques.

La déficience congénitale d'adhésion leucocytaire de type II, qui résulte d'un défaut dans le métabolisme du fucose, se traduit par l'absence de SLe^x à la surface des neutrophiles, alors incapables d'adhérer à l'endothélium (15). Les souris transgéniques « *knock-out* » pour les gènes des sélectines E (18) ou P (19) montrent un recrutement des neutrophiles retardé, mais pas aboli. La combinaison des deux abolit le recrutement aux foyers inflammatoires et cause une leucocytose sévère (20). Les souris déficientes en sélectine L montrent également un recrutement altéré dans plusieurs situations inflammatoires (21).

Adhésion ferme

La phase de roulement est suivie par l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales, via l'interaction des intégrines leucocytaires aux molécules d'adhésion cellulaires (CAM) endothéliales :

| ENDOTHELIUM | LEUCOCYTE |
|--|--|
| ICAM-1 (<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-1</i>) = CD54 | LFA-1 = $\alpha_L\beta_2$ = CD11a/CD18 Mac-1 = $\alpha_M\beta_2$ = CD11b/CD18 |
| VCAM-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>) = INCAM-110 = CD106 | VLA-4 (<i>Very Late Antigen-4</i>) = $\alpha_4\beta_1$ = CD49d/CD29 $\alpha_4\beta_7$ |
| ICAM-2 = CD102 | LFA-1 = $\alpha_L\beta_2$ = CD11a/CD18 |
| MadCAM-1 (<i>Mucosomal addressin-Cell Adhesion Molecule-1</i>) | $\alpha_4\beta_7$ Sélectine L |

ICAM-1, 2 et 3, VCAM-1 appartiennent à la famille IgSF (*Immunoglobulin-like SuperFamily*). Cette famille de récepteurs membranaires possède une partie extracellulaire contenant un ou des domaines de type immunoglobuline, une homologie qui suggère une origine génétique commune des molécules d'adhésion (reconnaissance soi/soi) et des anticorps (reconnaissance soi/non-soi). De multiples fonctions sont attribuées à ses membres, qui comprennent notamment les molécules CMH-II, les récepteurs de l'IL-1, et dont N-CAM fut le premier découvert (22). Le rôle de certains de ces membres dans le développement a été théorisé par Edelman (hypothèse morphogénétique) (23).

ICAM-2 est exprimée constitutivement à la surface endothéliale, indépendamment des cytokines. ICAM-1 et VCAM-1 sont, au contraire, sur-exprimées sous l'effet des cytokines proinflammatoires, plus tardivement mais de manière plus persistante que les sélectines. Leur régulation apparaît complexe, car sous l'influence de nombreux facteurs plus ou moins spécifiques de l'une ou l'autre protéine. (Voir la partie A-4-3 pour une distinction plus détaillée de ces 2 protéines.) Les souris transgéniques générées par inactivation du gène ICAM-1 se développent normalement mais montrent des défauts de recrutement leucocytaire dans plusieurs conditions inflammatoires (24), alors que l'inactivation du gène VCAM-1 est létale (18), à cause d'un développement défectueux du système circulatoire (25, 26). L'inactivation conditionnelle de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales et hématopoïétiques (système Cre-Lox) indique un rôle dans le recrutement et la maturation des lymphocytes dans la moelle osseuse (27, 28).

Sur cellules endothéliales de capillaires cérébraux humains (*HBMEC*) (29) comme sur cellules de cordon ombilical humain (*HUVEC*) ((30)), lorsque celles-ci sont non stimulées, des anticorps bloquant ICAM-1 réduisent l'adhésion, au contraire de ceux bloquant VCAM-1, qui sont sans effet. De même, des anticorps bloquant ICAM-1 réduisent la migration trans-endothéliale à travers des *HBMEC* ou *HUVEC* activées, ce qui n'est pas le cas des anticorps bloquant VCAM-1. Pourtant, il existe une signalisation intracellulaire consécutive à la liaison à l'intégrine ligand dans le cas de ICAM-1 (31), comme de VCAM-1 (32). Récemment, un rôle de VCAM-1 dans l'initiation de la diapédèse a été suggéré par l'interaction avec la protéine sécrétée SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) (33). Il apparaît donc de plus en plus clairement, malgré des difficultés méthodologiques, que ces molécules d'adhésion ne jouent pas un rôle purement « adhésif », mais préparent activement l'étape de transmigration en induisant un remodelage du cytosquelette de la cellule endothéliale.

Les intégrines utilisées par les leucocytes ont en commun la sous-unité β_1 (CD29) ou β_2 (CD18), qui peut être associée à 4 sous-unités α : α_L (CD11a), α_M (CD11b), α_X (CD11c), α_{mD} (CD11d). L'une des plus importantes intégrines est formée par l'association $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18 ou Mac-1), encore appelée CR3 (Complement Receptor 3), et exprimée par les neutrophiles, lymphocytes NK, monocytes et macrophages. VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), qui fonctionne comme récepteur d'adhésion cellulaire (liaison à VCAM-1) et matricielle (liaison à la fibronectine) (34), est lui, absent de la surface des neutrophiles. De fait, dans le cas de la déficience congénitale d'adhésion leucocytaire de type I, qui provient d'une inactivation de la sous-unité β_2 par mutation, les neutrophiles ne migrent plus vers les foyers inflammatoires alors que les lymphocytes conservent cette capacité (12). Les autres classes d'intégrines sont plutôt impliquées dans les phénomènes d'aggrégation plaquettaire (β_3) et de domiciliation des lymphocytes vers les organes lymphoïdes secondaires (β_7) (35).

Les intégrines sont stockées dans des granules cytoplasmiques et transportées à la membrane cellulaire pour constituer des complexes d'adhésion focale. Ces récepteurs se trouvent normalement dans un état inactif ou de faible affinité pour leur ligand, et subissent, par l'activation de la cellule, un changement conformationnel les faisant passer à l'état actif ou de forte affinité pour leur ligand. Cette modulation allostérique repose sur une cascade signalétique dite « *inside-out* », extrêmement rapide, qui lie le cytosquelette actinique à l'environnement extracellulaire via un assemblage complexe de tyrosine kinases et de protéines adaptatrices (36). L'activation des intégrines peut provenir de la liaison à une cellule présentant l'antigène, ou à la surface endothéliale induisant le roulement. Les chemokines libérées sont également efficaces, via l'activation de petites GTPases de la famille RAS (37). Cette modulation rapide et transitoire de l'activité des intégrines permet le contrôle local et temporel de l'attachement de la cellule immunitaire sur la surface endothéliale.

Les anticorps bloquant CD18, c'est-à-dire la sous-unité β_2 , ont un spectre d'action très large, montrant l'ubiquité de l'interaction moléculaire ICAM-1/LFA-1 dans l'inflammation (15). Les modèles transgéniques indiquent quant à eux un recrutement prédominant des neutrophiles via les intégrines β_2 , alors que les intégrines α_4 seraient plutôt sélectives du recrutement des monocytes (38). Cette sélectivité proviendrait de la capacité par certains couples CAM/intégrine de supporter le roulement en plus de l'adhésion ferme (39, 40). Les différences entre études de blocage (anticorps) et d'inactivation (*knock-out*) peuvent cependant résulter de mécanismes de compensation chez les animaux transgéniques (41).

Diapédèse

L'adhésion ferme (et donc l'arrêt) des leucocytes déclenche la projection de pseudopodes vers l'endothélium et l'étalement de la cellule immunitaire sur la surface endothéliale. La transmigration endothéliale s'effectue en quelques minutes après l'arrêt, par les jonctions intercellulaires et parfois par les pores endothéliaux (*transcytosis*). Les jonctions cellulaires endothéliales sont déstabilisées par des changements du cytosquelette, sous la dépendance de flux calciques intracellulaires et de molécules solubles (histamine, thrombine). Les interactions des molécules en jeu sont en général homophiliques (37, 42):

| ENDOTHELIUM | LEUCOCYTE |
|---|----------------|
| JAM-A (<i>Junctional Adhesion molecule-A</i>) | JAM-A |
| JAM-B | JAM-C |
| VE-cadherin (<i>Vascular Endothelial cadherin</i>) | VE-cadherin |
| CD99 | CD99 |
| PECAM-1 (<i>Platelet/Endothelial Cell-Adhesion Molecule-1</i>) = CD31 | PECAM-1 = CD31 |

Les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAMs) appartiennent à la famille IgSF (43). Elles sont présentes dans les jonctions serrées, et pourraient se lier à certaines intégrines au cours de la transmigration. Dans les jonctions adhérentes se trouvent la VE-cadherin, qui ne joue pas de rôle actif, et un autre membre de l'IgSF, PECAM-1 (37). L'interaction PECAM-1/PECAM-1 (à la fois endothéliale-endothéliale et endothéliale-leucocytaire) est à la base d'un mécanisme de type « fermeture-éclair moléculaire », nommée migration haptotactique : le changement d'affinité associé au passage de l'interaction endothéliale-endothéliale à celle endothéliale-leucocytaire provoque un gradient guidant la migration le long de la jonction (42). L'interaction CD99/CD99 est cruciale pour achever le passage des leucocytes à travers la jonction (44). Enfin, les connexines permettraient un couplage endothelium-leucocyte au niveau des « gap junctions », mais le rôle de cette interaction dans la diapédèse est encore controversé (37).

Ensuite la membrane basale est franchie par rupture protéolytique (enzymes secrétées : MMP (*Matrix MetalloProteinases*), collagénase, élastase ; ou associées à la membrane : uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*), dont le ligand catalyse la formation de plasmine) (42). Ensuite, les leucocytes migrent par chimiotactisme à travers la matrice extracellulaire du tissu vers le site inflammatoire. La progression cellulaire se fait au prix d'une succession coordonnée d'étapes d'adhésion, de détachement, et de protéolyse, impliquant des réarrangements du cytosquelette actinique incessants.

Parmi les nombreuses données sur l'adhésion cellulaire issues des travaux sur cultures de cellules, toutes ne sont pas facilement interprétables, et seule une partie a pu être confirmée *in vivo*. En effet, nombre d'études ont d'abord été menées en conditions statiques, sans prise en compte du flux, et donc de la phase de roulement, rendant caduque la distinction du rôle des sélectines et des CAM. L'apparition des chambres d'incubation avec flux a permis de pallier à cet inconvénient, et des études en vidéo-microscopie (45) ou microscopie de force atomique (46) permettent maintenant d'accéder à des paramètres physico-chimiques de l'adhésion cellulaire à partir de la déformation cellulaire ou protéique.

Mais l'étude de la diapédèse reste à ce jour le parent pauvre de l'adhésion cellulaire. Les temps d'incubation nécessaires pour observer une migration de l'ordre de 10 microns de profondeur sont considérables (une heure à une journée, selon les protocoles (29, 30)), peu représentatifs de la situation *in vivo*, et les clichés de microscopie électronique issus de tels expériences sont à l'origine de la controverse concernant l'existence d'une migration à travers le cytoplasme d'une cellule endothéliale.

Malgré un répertoire limité et pourtant redondant, l'expression polarisée (luminale, jonctionnelle) et finement régulée de récepteurs et molécules de l'adhésion (dont les plus importants sont représentés fig.5) permet de concert avec les médiateurs de l'inflammation, le

recrutement sélectif des cellules immunitaires activées, au détriment d'une adhésion spontanée. Celle-ci est également inhibée par le glycocalyx, une couche de glycoaminoglycans recouvrant la surface endothéliale, qui, intact, empêche l'accès aux molécules d'adhésion et est enzymatiquement dégradé au cours de l'inflammation (1).

La sur-expression augmentée des molécules d'adhésion en conditions inflammatoires s'accompagne pour la majorité d'entre elles de la production de formes solubles. Elles sont en général attribuées à une coupure protéolytique à la membrane, mais la relation exacte entre l'expression cellulaire et la quantité de forme soluble produite est inconnue, tout comme le rôle potentiel de ces formes (47). Un lien avec l'angiogenèse, donc la résolution de l'inflammation, a été suggéré (48).

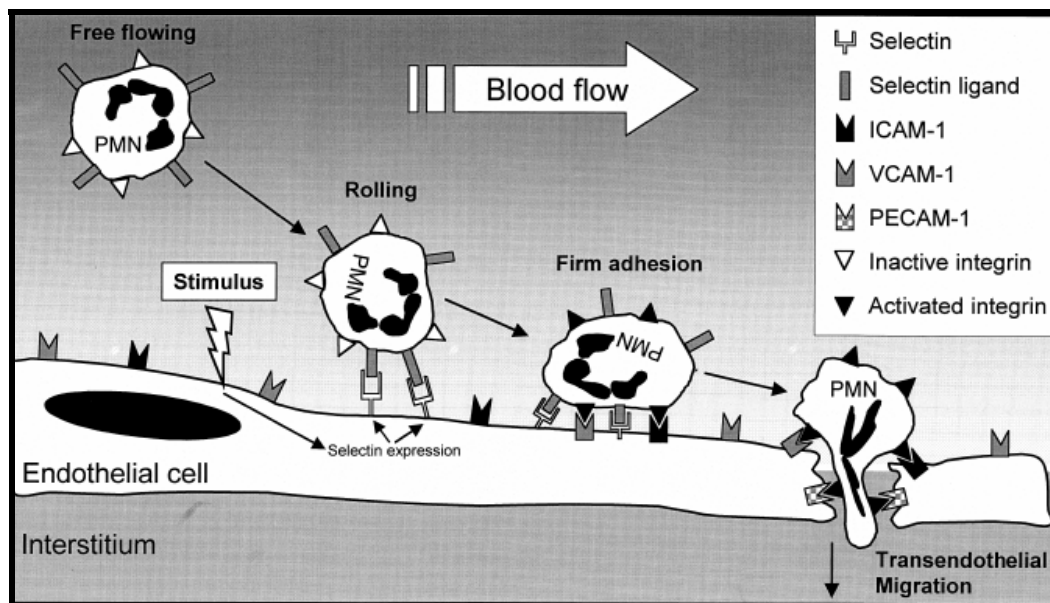


Figure 5. Modèle multi-étape de la migration leucocytaire incluant les principaux récepteurs endothéliaux, extrait de Krieglstein et Granger, 2001 (49).

Le système des molécules et des récepteurs de l'adhésion est probablement très ancien du point de vue de l'évolution, puisqu'il est à l'oeuvre dans l'embryogénèse, la croissance et la différenciation cellulaire, en plus de l'inflammation. On le retrouve donc associé à plusieurs classes de pathologies, dont les pathologies vasculaires, les cancers, les maladies de la peau, les infections bactériennes (14, 20, 49, 50). Logiquement, la sur-expression de récepteurs ou molécules d'adhésion vasculaires est impliquée dans nombre de situations pathologiques inflammatoires, soit aiguës (rejet de greffe (51), réaction allergique (52), choc septique (53), ischémie-reperfusion (54)), soit chroniques (arthrite rhumatoïde (9), athérosclérose (47), lupus (55), inflammation intestinale (56), hypertension (57)).

Les thérapies « anti-adhésives » visent à obtenir un effet anti-inflammatoire en inhibant l'adhésion leucocytaire. L'aspirine et les autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) ont probablement, indépendamment de leur action sur la production de prostaglandines via l'inhibition des COX, des effets additionnels interférants avec l'adhésion cellulaire, même si ces derniers restent largement incompris (58). La perspective d'inhiber spécifiquement les récepteurs de l'adhésion fait des sélectines, CAM et intégrines, des cibles thérapeutiques aux applications particulièrement vastes (59).

1-3) Cas du système nerveux central (SNC)

Le cerveau constitue un tissu particulier, aux capacités de renouvellement très limitées, dont découle la nécessité de limiter les dommages inhérents à toute réaction inflammatoire et immunitaire. Le rejet retardé ou absent des greffes expérimentales est à la base de la notion de statut « privilégié du point de vue immunitaire » du cerveau (60). La présence d'une barrière endothéliale physique, la barrière hématoencéphalique (BHE), supposée restreindre l'accès des cellules immunitaires, ainsi que l'absence de drainage lymphatique et la faible expression des molécules CMH semblent affirmer le « défaut immunitaire » du cerveau. Mais ce statut n'est pas absolu, et a été largement remis en cause durant la dernière décennie (61). Le terme « privilégié » est donc maintenant remplacé par « spécialisé » dans la littérature (62, 63), pour exprimer que des réactions immunitaires aussi robustes et efficaces qu'en périphérie ont bien lieu dans le cerveau, mais qu'elles possèdent leurs acteurs et leurs caractéristiques propres.

La première et la plus évidente est la présence de la BHE, qui sépare anatomiquement le parenchyme cérébral de la circulation. Elle maintient l'homéostasie cérébrale en limitant la diffusion moléculaire et la migration cellulaire, tout en assurant l'approvisionnement en nutriments par des systèmes de transport spécifiques. Les cellules endothéliales forment entre elles des jonctions serrées, et sont apposées sur une membrane basale très épaisse, ce qui limite les flux paracellulaires. Elles ont également une faible capacité d'endocytose limitant les flux transcellulaires. Autour des vaisseaux se trouvent des péricytes et des macrophages périvasculaires, ainsi des pieds astrocytaires assurant l'intégrité de la structure (fig. 7). La BHE subit donc des influences multicellulaires ce qui la rend difficilement reproductible *in vitro* (64).

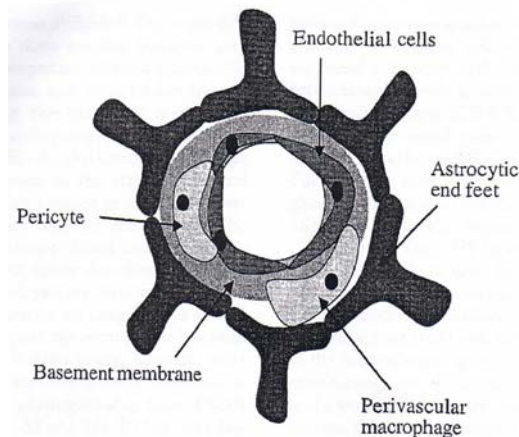


Figure 6. Schéma de l'organisation cellulaire de la BHE en coupe transverse, extrait de Bailey *et al.*, 2006 (62).

Pourtant, dans le cas du cerveau, le rôle de l'endothélium dans le recrutement leucocytaire a aussi été largement étudié sur cultures cellulaires, les cellules *HUVEC* ou *HEV* étant remplacées par des cultures primaires de cellules *HBMEC* (29). Ces études ont montré que les conditions inflammatoires, caractérisées par une forte production de cytokines, augmentent la perméabilité de la BHE vis-à-vis des macromolécules, et favorisent les infiltrations leucocytaires, dont les déterminants moléculaires (sélectines, molécules d'adhésion, intégrines, chimiokines) sont globalement les mêmes qu'en périphérie. Mais, *in vivo*, le rôle prépondérant des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 est reconnu, tandis que celui des sélectines reste controversé. La cytokine VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), comme signal angiogénique augmentant la perméabilité, et les protéinases MMP, qui dégradent localement la membrane basale contribue notamment à l'ouverture de la BHE (65).

La surveillance immunitaire du cerveau, longtemps ignorée, est pourtant réalisée par une population, certes réduite, de lymphocytes T activés, qui, en dehors de toute situation inflammatoire, traverse la BHE à la recherche de leur antigène spécifique (66). Ces entrées sont limitées par un micro-environnement assurant une faible expression de molécules d'adhésion, laissant aux seules sélectines (et notamment à la sélectine-P (67)) qui sont rapidement inductibles, le rôle moteur pour le recrutement de leucocytes « pionniers », qui apparaît comme un événement aléatoire.

D'autres « portes d'entrée » pour les leucocytes se situent au niveau des organes circumventriculaires (accès au liquide céphalo-rachidien (LCR) à travers les plexus choroïdes, et à l'espace subarachnoïde) (63, 68, 69).

L'entrée des lymphocytes B est beaucoup moins documentée : tandis que dans un certain nombre de conditions pathologiques, ils accèdent au parenchyme cérébral et y produisent des anticorps (IgG notamment), un rôle de surveillance immunitaire similaire à celui des lymphocytes T est possible mais n'a pas été démontré expérimentalement (66). Les monocytes sont la principale population leucocytaire infiltrée dans la plupart des conditions neuroinflammatoires, et l'entrée des neutrophiles reste quant à elle associée à des événements extrêmes (abcès bactérien, ischémie reperfusion) (63).

Indépendamment de leur production au niveau cérébral par les cellules résidentes, les cytokines produites en périphérie sont susceptibles de moduler certaines fonctions dans le SNC (fièvre, etc...). Leur « passage » de la BHE peut se faire de plusieurs façons, directes (transport actif, passage au niveau des organes circumventriculaires), ou indirectes (activation du nerf vague, induction d'une production de cytokines par les astrocytes de la BHE, et bien sûr production par les cellules immunitaires infiltrées) (70). Cependant, l'état « immuno-déprimé » du cerveau sain est bien réel : plusieurs facteurs encore mal identifiés (cytokines, dont TGF- β , neuropeptides, hormones, récepteurs, dont CD200R) maintiennent les cellules immunitaires résidentes et infiltrées dans un état quiescent ou pro-apoptotique, élevant le seuil de déclenchement d'une réponse inflammatoire et prévenant une réponse immunitaire spécifique par la répression de l'expression des molécules CMH-II (62).

L'absence de vaisseaux lymphatiques dans le cerveau n'empêche pas la circulation des antigènes du SNC vers la périphérie. Leur trajet pour rejoindre le LCR est encore mal caractérisé : du liquide extracellulaire de la matière blanche, ils traverseraient l'épendyme des ventricules, qui est un endothélium fenestré, dénué de jonctions serrées ; du fluide interstitiel de la matière grise, ils voyageraient dans les espaces périvasculaires (de Virchow-Robins), contigus à l'espace subarachnoïde. La dilution entraînée par le grand volume de LCR pourrait expliquer la lenteur de la réponse immunitaire spécifique. Le LCR circule des ventricules à l'espace subarachnoïde et se résorbe très localement dans la circulation veineuse (arachnoïde villi, au niveau des sinus veineux) ou lymphatique (vaisseaux associés aux bulbes olfactifs, voire à d'autres nerfs)(63, 66). Ainsi, une réponse immunitaire spécifique peut être engendré dans les ganglions lymphatiques cervicaux.

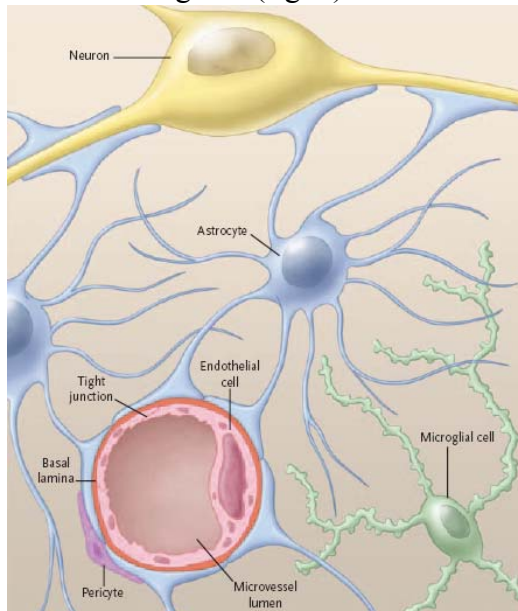
S'il existe à première vue un isolement relatif du SNC vis-à-vis du système immunitaire adaptatif, un système immunitaire inné fonctionnel est présent en son sein (71), et représenté par plusieurs population gliales hautement réactives (présentées ci-après). Notamment, la cascade du complément est active dans le cerveau (sans rupture de la BHE) (62).

Le « privilège » immunitaire du cerveau consiste finalement en une forte dissociation des réponses locales et systémiques de l'inflammation, un moyen de protéger le tissu cérébral,

mais qui prive de la possibilité de détecter facilement une réaction inflammatoire silencieuse, car non douloureuse (72). La dynamique de cette réponse suscite aujourd'hui beaucoup d'intérêt : il s'agit à la fois de comprendre son rôle dans l'évolution des différentes pathologies du SNC (73), et de passer outre pour délivrer *in situ* des médicaments potentiels transportés par des cellules (74), ou par des biomatériaux (75).

1-4) Immunité cérébrale innée

A l'échelle cellulaire, le maintien de l'intégrité de la BHE et d'un micro-environnement « immuno-déprimé » repose sur l'association de plusieurs types cellulaires au sein d'une unité neurovasculaire. Il s'agit d'un cadre conceptuel d'analyse récemment développé (76) dont la composition peut varier localement, mais qui comprend généralement, outre le neurone et la cellule endothéliale, l'astrocyte, la membrane basale, le péricyte et la cellule microgliale (fig. 7).



Ces cellules résidentes orchestrent les processus neuroinflammatoires, ce qui constitue la spécificité de la réponse immunitaire cérébrale (7, 62, 66, 77, 78).

Figure 7. Composition cellulaire de l'unité neurovasculaire, dessin extrait de Del Zoppo, 2006 (76).

Cellules résidentes

Les astrocytes sont des cellules d'origine neuro-ectodermale qui participent au métabolisme énergétique, à la transmission synaptique, et à la formation de la BHE. C'est la population gliale la plus nombreuse. Elles répondent à une perturbation quelconque par un changement de morphologie caractéristique : la cellule devient hypertrophique. Les astrocytes expriment certains TLR, dont la stimulation induit une réponse pro-inflammatoire : expression des interférons de type I, de NOS, et de diverses cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6). La localisation péri-endothéliale des pieds astrocytaires rend leur expression des CAM, et leur production de chimiokines très efficace pour le recrutement des cellules du système immunitaire adaptatif. La contribution astrocytaire au recrutement permettrait aux cellules immunitaires de quitter l'espace péri-vasculaire et de rejoindre le parenchyme cérébral (79). La présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes T par les astrocytes est controversée : elle serait possible par une expression inductible de CMH II et une

costimulation médiée par les molécules d'adhésion (80), mais cela n'a pas été démontré *in vivo*. Finalement, la conception dominante attribue aux astrocytes une fonction immuno-régulatrice négative, garante du privilège immunitaire cérébral.

La microglie (les cellules microgliales), est traditionnellement considérée comme une population de « macrophages résidents ». Selon l'hypothèse la plus communément acceptée aujourd'hui, cette population dérive de l'invasion précoce du cerveau en développement par des monocytes précurseurs. Chez l'adulte, ces cellules ont un très faible taux de renouvellement, et sont distribuées dans l'ensemble du cerveau. Elles représenterait 10 à 15% des cellules cérébrales. A l'état quiescent, leur morphologie est ramifiée, et leur prolongements, extrêmement mobiles contrairement à ceux des neurones et des astrocytes, sondent en permanence le milieu extracellulaire, et en exercent une surveillance active (81). Elles sont en effet équipées pour détecter l'activité neuronale (récepteurs glutamatergiques et GABAergiques), ainsi que les vagues de calcium astrocytaires (récepteurs purinergiques) (82). Leur morphologie change drastiquement en réponse à des stimuli variés - les prolongements se rétractent et deviennent hypertrophiques - jusqu'à devenir indistincte d'un macrophage d'origine périphérique. Elles conservent, au contraire de ces derniers, une capacité de prolifération. La microglie activée est considérée comme l'acteur principal de l'initiation et la propagation des réponses inflammatoires au niveau cérébral : en plus de la production d'interférons et de chimiokines, l'expression des TLR et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12) est plus variée et plus forte que celle des astrocytes. Au stade ultime de l'activation, les cellules ont une activité phagocytaire et peuvent produire quantité de radicaux libres (*oxidative burst*). Les cellules microgliales activées sont également les candidates naturelles du parenchyme cérébral pour l'initiation d'une réponse immunitaire antigène dépendante. Pourtant, si la capacité de présenter l'antigène est acceptée (expression de CMH II), l'expression des molécules de co-stimulation et l'effet induit sur les lymphocytes T sont discutés, et varient vraisemblablement selon l'état d'activation microgliale et selon les espèces. Comme pour les astrocytes, des résultats obtenus sur des cultures de cellules isolées d'un cerveau en développement requièrent une confirmation *in vivo*, qui se heurte pour l'instant à des problèmes de purification. La cytotoxicité potentielle de la microglie activée envers les neurones est au coeur des débats sur le rôle néfaste de la neuroinflammation dans les maladies neurodégénératives.

Des macrophages sont présents en nombre non négligeable dans le CNS sain, et associés aux espaces péri-vasculaires (des méninges, des plexus choroïdes et du parenchyme). Ils sont continuellement renouvelés à partir de la moelle osseuse. Ils sont distingués des cellules microgliales activées par une forte expression de CD45. Leur positionnement anatomique en fait des cellules efficaces pour la présentation de l'antigène, avec, de manière constitutive, une activité phagocytaire et une forte expression de CMH II. Par contre, leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires n'a pas été démontrée.

Les péricytes sont des cellules relativement indifférenciées, étroitement associées aux cellules endothéliales et entourées par la membrane basale. En situation pathologique, ils possèdent une capacité de prolifération relative, au contraire des macrophages périvasculaires ou infiltrés qui ne prolifèrent pas du tout. Ils peuvent se différencier en macrophages ou en cellules de muscle lisse. Il s'agit donc d'une population versatile qui assure à la fois un important support structural à la microcirculation et aux fonctions de la BHE, tout en constituant le premier rempart immunologique du cerveau, notamment par la présentation de l'antigène.

Enfin, la présence d'une petite population résidente de cellules dendritiques serait limitée aux méninges et au stroma des plexus choroïdes dans un cerveau sain, elles pourraient être recrutées en situation neuroinflammatoire (83). CPA professionnelles par excellence, leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires, et donc leur rôle dans l'induction d'une réponse immunitaire cérébrale n'est pas clairement établi.

Ces quatre derniers types cellulaires, microglie, macrophages, péricytes et cellules dendritiques, sont issues de la même origine myéloïde (monocytaire), ce qui rend leur différenciation phénotypique complexe. Hormis l'aspect surfacique dit « épineux », caractéristique de la microglie en microscopie électronique, il n'existe pas de marqueur spécifique unique, membranaire ou biochimique, permettant l'identification et la distinction de ces types cellulaires. Ce problème majeur de la neurobiologie actuelle contribue à alimenter les débats sur la nature cellulaire des cellules présentant l'antigène *in vivo* (84) et indirectement, sur le rôle bénéfique ou nuisible de l'inflammation en général, et de l'activation de chaque type cellulaire en particulier (cf partie A-1-5 pour cette discussion).

Gliose et activation microgliale

La gliose désigne la réactivité cellulaire gliale à un stimulus pathologique, que celui-ci menace l'intégrité cérébrale ou consiste en une altération subtile du micro-environnement. Les oligodendrocytes ont la capacité de proliférer en réponse à une atteinte neuronale (85), mais n'affectent pas directement la réponse immunitaire. La gliose concerne donc les astrocytes et les cellules microgliales, et les termes d'astrogliose et microgliose sont parfois employés. Il s'agit d'une réponse locale, stéréotypée, accompagnant tout dommage ou souffrance neuronale, réversible ou non. Les cellules changent drastiquement de morphologie, prolifèrent (dans le cas de la microglie), et investissent la zone lésée et son pourtour, jusqu'à constituer une « cicatrice gliale » isolant la zone lésée du reste du parenchyme cérébral. Pour ces raisons, il est tout à fait justifié de parler d'inflammation, préalable ou parallèle à un recrutement immunitaire spécifique éventuel (86).

Les déterminants moléculaires des interactions entre ces 2 types cellulaires et les neurones voisins restent largement inconnus : on ne connaît pas précisément quels facteurs déclenchent l'activation, mais certains doivent émaner des neurones voisins endommagés. L'ATP, le potassium extracellulaire, la cytokine M-CSF (via astrocytes (87)), certains neuropeptides et/ou neurotransmetteurs sont des candidats issus de travaux *in vitro*, dont la production et l'effet activateur ne sont pas clairement démontrés *in vivo* (61).

Récemment pourtant, la microscopie trans-crâniale bi-photonique a permis d'étudier les toutes premières étapes de la réactivité microgliale. Deux groupes ont utilisé le marquage fluorescent sélectif des cellules microgliales pour démontrer que leur première réaction à l'état quiescent consistait en un mouvement rapide des prolongements microgliaux vers le site lésé (microlésion au laser) (88, 89). Cet effet chimiotactique fait intervenir les récepteurs purinergiques (90). Les astrocytes voisins pourraient participer à l'amplification du signal avant sa détection par la cellule microgliale (fig. 8).

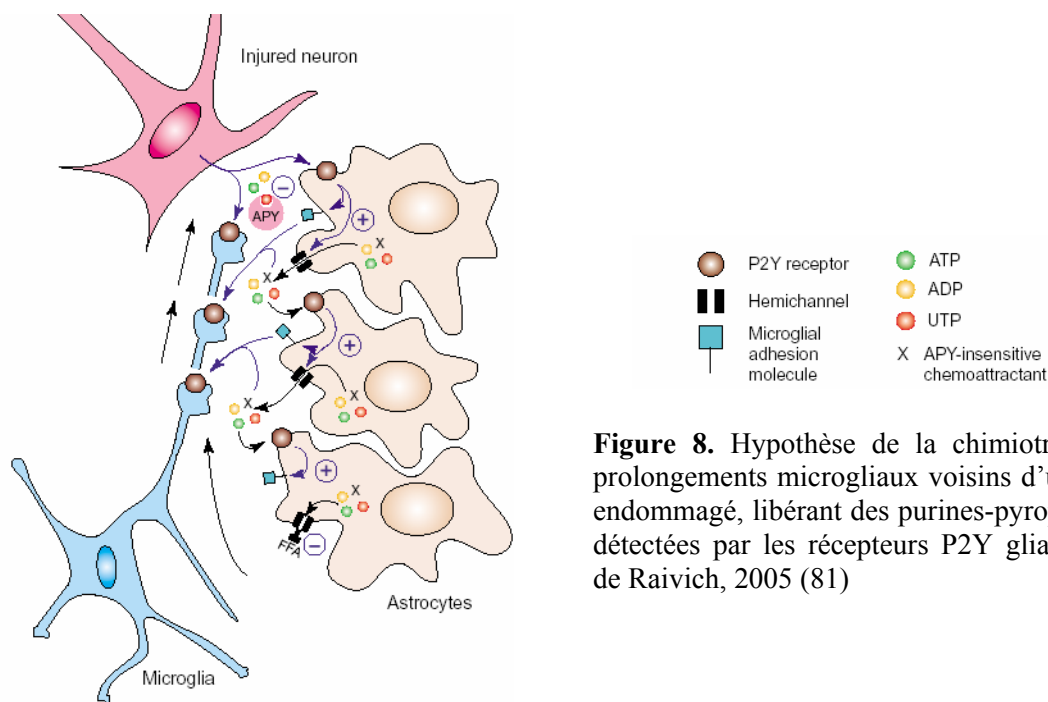


Figure 8. Hypothèse de la chimiotraction des prolongements microgliaux voisins d'un neurone endommagé, libérant des purines-pyrophosphates détectées par les récepteurs P2Y gliaux. Extrait de Raivich, 2005 (81)

Ces travaux, utilisant une approche peu invasive, et disséquant le mécanisme moléculaire d'activation microgliale *in vivo* ont logiquement reçu beaucoup d'attention (91-93).

Le paradigme classique d'activation de la cellule microgliale doit beaucoup aux travaux pionniers du groupe de Kreutzberg sur le modèle d'axiotomie du nerf facial, une lésion sub-léthale de motoneurones, qui préserve la BHE (94). La réponse microgliale dans ce modèle a été définie comme graduelle, et strictement contrôlée. Au contact de la microglie en prolifération, de morphologie hypertrophique (*bushy*), les auteurs observaient d'abord le détachement des boutons synaptiques afférents à la surface des motoneurones lésés (*synaptic stripping*). Une activité phagocytaire, associée à une morphologie de macrophage, était observée seulement en cas de mort neuronale. Ce n'est qu'ensuite que les astrocytes réactifs hypertrophiés prenaient place autour du motoneurone, l'isolant du reste du réseau. Cette dichotomie dépendante de l'état du motoneurone a conduit à l'idée d'une plasticité fonctionnelle, la morphologie reflétant le statut fonctionnel de la cellule microgliale (fig. 9). Il est intéressant de remarquer que la transformation est l'inverse de celle survenant au cours du développement, la microglie passant alors d'un état « activé » (améboïde) à un état « quiescent » (ramifié), sans que l'on sache si ce phénotype améboïde « primitif » est associé à une activité phagocytaire ou reflète un état indifférencié (61).

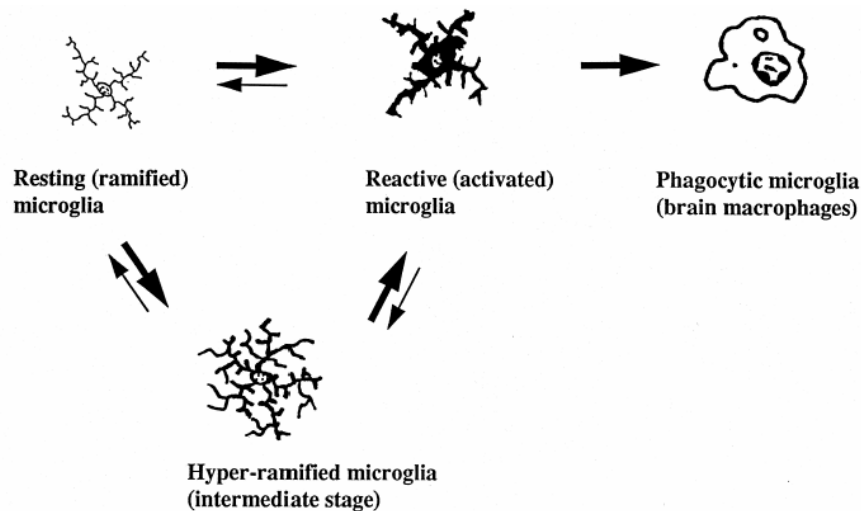


Figure 9. Stades de l'activation microgliale et morphologie cellulaire, selon Streit, 1999 (61).

A ces changements morphologiques sont associés des changements immunophénotypiques, ainsi que la production de nombreuses cytokines, largement documentés dans le modèle de lésion axonale du chemin perforant entorhino-dentate (fig. 10) (95). La présentation de l'antigène est en général considérée comme une capacité propre de la microglie activée.

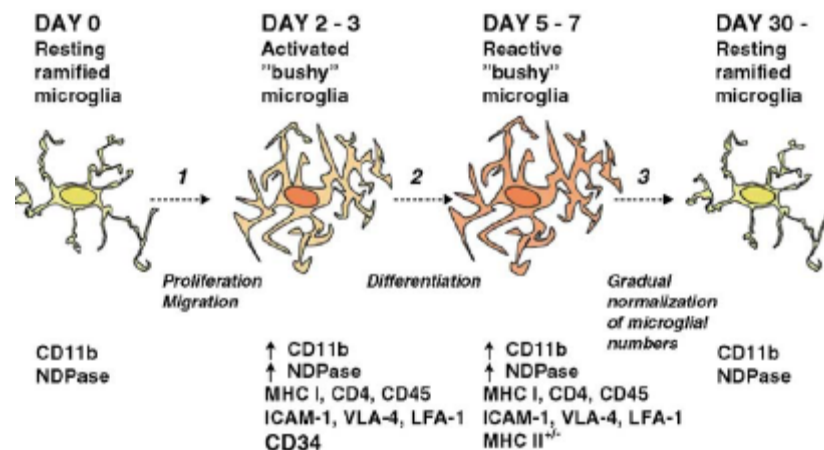


Figure 10. Stades de l'activation microgliale et expression de marqueurs immunologiques, selon Ladeby *et al.*, 2005 (95).

Cependant, l'aspect linéaire et graduel de la transformation microgliale apparaît de plus en plus artificiel, et certains auteurs parlent maintenant, en référence aux 2 types de réponses immunitaires périphériques, d'un continuum d'activation entre 2 états (activés) extrêmes : l'activation innée, caractérisée par une réponse phagocytaire, et l'activation adaptative, caractérisée par une fonction de présentation de l'antigène (96).

L'augmentation du nombre de cellules microgliales au site lésionnel a plusieurs sources, non exclusives : prolifération, migration de régions cérébrales adjacentes, et recrutement de progéniteurs circulants. On savait, en conditions normales et chez l'adulte, que le renouvellement était très lent, et qu'il reposait certainement sur des divisions *in situ* et un recrutement de cellules circulantes (97). Cet aspect a récemment suscité beaucoup d'intérêt après la démonstration d'un recrutement spécifique au site lésionnel de progéniteurs chez des

animaux chimères de la moelle osseuse (95). Si l'idée d'utiliser les cellules souches comme cheval de Troie pour atteindre une lésion cérébrale apparaît possible, ce recrutement pose la question de l'homogénéité de la population microgliale observée à un instant donné.

L'intérêt pour les fonctions des cellules microgliales n'a cessé de croître depuis la fin des années 90, comme en témoigne l'évolution exponentielle de la littérature à ce sujet (98). La plasticité de ces cellules est étonnante, et comme acteurs intrinsèques de la réponse immunitaire cérébrale, elles influencent l'évolution de toutes les formes de neuropathologies.

1-5) Dualité de la réponse inflammatoire

Parce qu'elles initient la réaction inflammatoire cérébrale, les cellules microgliales sont susceptibles d'orienter le profil de la réaction immunitaire consécutive, par la promotion des lymphocytes Th1 ou Th2. Ces cellules résidentes sont donc au coeur de la notion de réponse inflammatoire duale, tantôt bénéfique et tantôt nuisible. Et les médiateurs de l'inflammation sont, dans le cerveau plus qu'ailleurs, une arme à double tranchant, à la fois comme protection envers les infections et comme toxicité potentielle envers le tissu sain, non renouvelable.

La cytotoxicité potentielle de la réponse microgliale est identifiée depuis longtemps, soit par contact direct, en tant que cellules phagocytaire, soit par l'intermédiaire de substances sécrétées (78). Des co-cultures de microglie et de neurones ou d'oligodendrocytes ont clairement montré que les FRO (*ROS*) et les aminés excitotoxiques provenant des cellules microgliales entraînent une mort cellulaire (99). Cependant, des contradictions émergent dans la littérature, puisque les cellules microgliales humaines n'exprimeraient pas la forme inducible de NOS (*iNOS*), et le radical NO^\bullet serait produit par les astrocytes, au contraire des rongeurs (100). Le répertoire de cytokines et chemokines produites constitutivement est important, et pour la plupart, les quantités sont augmentées après une stimulation pro-inflammatoire au LPS. De plus, les ARN messagers des récepteurs des cytokines pro- et anti-inflammatoires les plus courantes sont détectés. Les voies de signalisation des kinases JNK et p38 MAP sont mises en jeu dans la production du $\text{TNF-}\alpha$, alors que la sécrétion de facteurs de croissance (BDNF) serait associée à la cascade de la protéine kinase C (101). Les CSF (M-CSF et GM-CSF) induisent une forte activité mitogène, et seraient les déterminants de la prolifération gliale (100).

La quantité importante de données issues de travaux sur cultures cellulaires ne doit être extrapolée qu'avec prudence à la situation *in vivo*, car la mise en culture induit inévitablement un changement du métabolisme cellulaire susceptible de biaiser la réponse à un stimulus appliqué *in vitro*.

Il existe de nombreuses lignées astrocytaires et la culture primaire à partir de mammifères et de tissu humain est bien maîtrisée. Mais il est difficile d'obtenir une pureté supérieure à 95%, et la contamination microgliale des cultures peut entraîner de fausses conclusions sur la source d'une molécule détectée.

La microglie mise en culture provient en général du cerveau d'un animal nouveau-né, et des cultures humaines à partir d'échantillons foetaux et adultes ont été décrites. Les morphologies obtenus en cultures sont variées (102) et la prolifération limitée, même en

présence de facteurs de croissance (103). De nombreuses méthodes ont été décrites pour vérifier la pureté, dont l'induction d'une activité phagocytaire au contact de billes de latex (72). Certains auteurs (61) considèrent de fait la cellule microgliale en culture comme une cellule hyper-activée. De nombreuses lignées ont été établies mais leur marqueurs phénotypiques ne sont pas toujours stables.

La définition de ces marqueurs est en soi un problème puisque microglie, macrophages périvasculaires ou infiltrés, péricytes et cellules dendritiques expriment tous CD11a, CD11b, F4/80, et les molécules MHC II et B7 de manière inductible. CD11c est un marqueur classique des cellules dendritiques, mais son expression par la microglie activée est discutée. Dès lors, la distinction en cytométrie de flux requiert l'antigène leucocytaire commun CD45 (62):

- $CD45^{high} CD11c^+ F4/80^-$ = cellule dendritique
- $CD45^{high} CD11b^+ F4/80^+ CD11c^-$ = macrophage
- $CD45^{low} CD11b^+ F4/80^+$ = microglie

Guillemin *et al.* ont réunis et sélectionnés 2 ensembles de marqueurs permettant de différencier la microglie des macrophages d'une part, des péricytes d'autre part (77). Ils tirent de leur revue de la littérature, malgré des contradictions, un profil microglial de consensus : $CD45^{low} CD11b^+ MHC\ class\ II^+ CD14^-$. Cette complexité résulte également d'une dépendance forte envers de nombreux paramètres difficilement contrôlables, dont évidemment l'état d'activation et de maturation, mais aussi la variabilité inter-espèce et l'hétérogénéité phénotypique. Il s'agit d'un obstacle majeur à l'interprétation des résultats obtenus sur des cultures cellulaires mais aussi sur des modèles animaux, puisqu'en conditions neuroinflammatoires, la distinction entre microglie activée et cellules immunitaires infiltrées requiert un marquage préalable des cellules sanguines ou la mesure de paramètres électrophysiologiques (courant potassique) (104).

In vivo, la toxicité des cellules microgliales envers les oligodendrocytes et les neurones serait médiée par l'activation cytokinique de voies apoptotiques, une production accrue de radicaux libres (stress oxydatif) et/ou une sur-activation glutamatergique (excitotoxicité). On considère généralement que l'activation microgliale chronique accompagnant certaines maladies neurodégénératives et leur modèles animaux est associée à un état pro-inflammatoire favorisant la mort neuronale. Un modèle générique proposé par Nguyen *et al.*, tente d'expliquer la vulnérabilité neuronale sélective observée dans ces maladies (fig. 11). Il repose sur la présence d'une inflammation périphérique ou d'une infection virale ou bactérienne du CNS comme déclencheur d'une réponse inflammatoire et immunitaire intempestive et auto-entretenu dans le cerveau. Ces hypothèses sont évoquées pour expliquer l'étiologie à présent inconnue de nombre de pathologies neurodégénératives mais elles ne reposent que sur des arguments indirects, comme par exemple, le rôle protecteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens, et l'existence de troubles cognitifs associés à l'infection par le virus du SIDA.

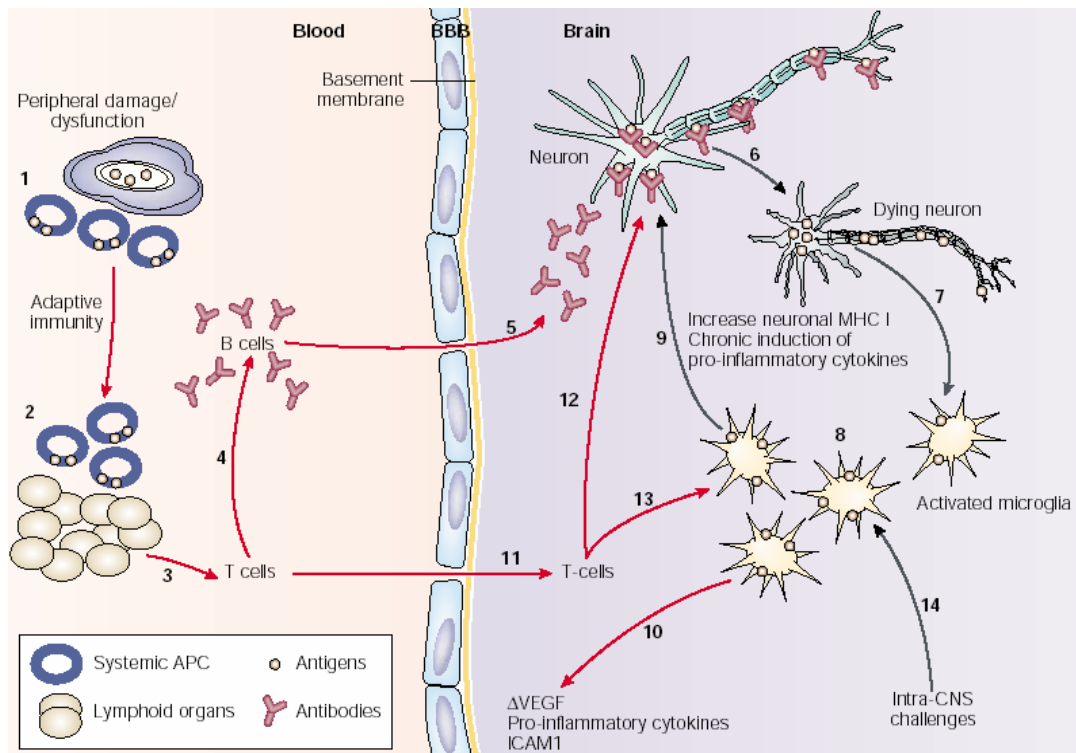


Figure 11. Mécanisme hypothétique de la neurodégénérescence sélective impliquant des acteurs de l'immunité innée et adaptative. Une réponse immunitaire périphérique induit le recrutement de CPA (1), qui migrent vers les organes lymphoïdes (2), et déclenchent l'expansion clonale des lymphocytes T (3) et la production d'anticorps par les lymphocytes B (4). La diffusion éventuelle de ces anticorps dans le SNC (5) pourrait perturber la fonction d'un antigène neuronal (6), conduire à la mort de la cellule (7), et déclencher l'activité phagocytaire de la microglie, alors susceptible de présenter un antigène neuronal à sa surface (8). Simultanément, la microglie produit des cytokines pro-inflammatoires et des molécules neurotoxiques (9). La réaction astrocytaire à cette production accroît la perméabilité de la BHE (10) et active l'endothélium vasculaire, autorisant l'infiltration lymphocytaire (11). L'action des lymphocytes T accroît la mort neuronale (12) et favorise la réponse microgliale (13) : l'inflammation est auto-entretenue. Alternativement, le déclencheur peut être une atteinte ou un pathogène cérébral (14) initiant une réponse immunitaire innée chronique et toxique, sans composante adaptative à l'origine. Extrait de Nguyen *et al.*, 2002 (71).

A l'inverse, dans certains modèles, la microglie activée semble participer avec les astrocytes à l'élimination du glutamate et du fer en excès, s'opposant ainsi aux effets oxydatifs et excitotoxiques (101). Le rôle neurotrophique des cellules gliales est tout aussi ambigu, puisque s'il existe une production importante de facteurs de croissance, la cicatrice gliale astrocytaire constitue un environnement inhibant la régénération axonale (105), et l'activation microgliale bloque la neurogenèse hippocampique (106, 107).

L'ablation conditionnelle des populations gliales est possible dans des animaux exprimant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpes (HSVTK) sous la dépendance de GFAP ou CD11b. Le traitement par une molécule anti-virale, substrat du gène suicide HSVTK, qui la transforme en un composé toxique, permet l'ablation respective des astrocytes et des cellules microgliales proliférants. L'ablation astrocytaire, en cohérence avec les résultats sur animaux « knock-out » (108), aggrave les dommages neuronaux en conditions neuroinflammatoires, par la perte de la fonction protectrice de la BHE (109, 110). En revanche, l'ablation CD11b-dépendante des cellules microgliales et des macrophages dégrade l'état des souris infectées par le virus neurotrophique Sindbis, soit directement par l'absence de cellules monocytaires, soit indirectement par un recrutement lymphocytaire altéré (111). Elle accroît la taille de l'infarct après une ischémie cérébrale (112), mais réprime le

développement de l'encéphalite auto-immune expérimentale, un modèle de la sclérose en plaques (113).

Cette dualité de la réponse cellulaire reflète dans une large mesure la dualité des actions des cytokines et chemokines. L'inhibition de l'IL-1 β par diverses méthodes est neuroprotective et réduit la taille de l'infarct dans des modèles d'ischémie (114), mais l'IL-1 β stimule la production astrocytaire de facteurs neurotrophiques (115). Benveniste a résumé de même les effets bénéfiques ou néfastes des cytokines IFN- γ , IL-6, et TGF- β sur les neurones, oligodendrocytes et cellules gliales (116). La dénomination pro- ou anti-inflammatoire apparaît largement artéfactuelle, et l'effet « net » de l'action d'une cytokine est dépendante du contexte (117).

Plusieurs hypothèses sont proposées pour lever ces contradictions apparentes. Blasko *et al.* (118), ainsi que Streit (119), avancent l'idée d'un vieillissement astrocytaire et microglial, qui, en induisant un état pro-inflammatoire, serait critique pour le développement des maladies neurodégénératives. La cellule microgliale dystrophique, dont les marqueurs restent à définir, serait par exemple incapable de phagocyter les dépôts fibrillaires de peptides amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (120). Graeber emploie de terme de gliodégénérescence (121) pour désigner les cellules gliales comme cibles premières des processus neurodégénératifs. Polazzi et Contestabile (122) proposent que la perte d'une communication spécifique avec les neurones en dégénérescence déclenche une activation incontrôlée des cellules microgliales, à l'origine d'une inflammation persistente. Cette thèse est appuyée par la découverte que l'expression neuronale des molécules MHC-I régule le détachement des synapses par la microglie lors d'une dégénérescence rétrograde (123, 124). Les travaux du groupe de Morale et Marchetti (125) suggèrent que le statut estrogénique conditionne la réponse gliale dans la maladie de Parkinson. Ceux du groupe de Schwartz (126, 127) attribue cette capacité de conditionnement de la réponse gliale aux cellules T autoréactives dans un paradigme neuroprotecteur et neurogénique.

Parallèlement, plusieurs études mettent en lumière une hétérogénéité de la population microgliale. Toutes les cellules recrutées sur le site d'une lésion ne présentent pas l'antigène, et certaines proviennent d'un pool de précurseurs circulants (95). Les cellules de différents individus (128) ou de différentes régions cérébrales (129) ne répondent pas de manière identique à un traitement cytokinique, alors que cela semble être le cas pour les astrocytes (130). De plus, la distribution locale des cellules microgliales n'est pas homogène, plus dense dans la matière blanche que dans la matière grise chez l'homme (131, 132), l'inverse ayant été décrit chez le rongeur (133, 134).

Il est donc probablement exact de voir dans la population microgliale une famille de cellules aux phénotypes variés, et de poser la question du bénéfice ou de la nuisance de la réaction gliale en ces termes (135) : comment ces phénotypes sont-ils acquis et en quoi diffèrent-ils ? Un phénotype spécifique est-il définitif ? Ou est-ce qu'une cellule destructive peut devenir protectrice, et conserver son phénotype dans un environnement neuronal en dégénérescence ?

La manipulation génétique de ces cellules a ouvert la voie à de nombreuses études, qui utilisent la microscopie à 2 photons ((88, 89), commentées précédemment) ou la microscopie de fluorescence (136). La partie suivante présente la contribution de l'imagerie nucléaire non invasive à la visualisation de la dynamique neuroinflammatoire.

2) Le récepteur périphérique aux benzodiazepines et l'imagerie de la neuroinflammation

L'imagerie non invasive est un outil précieux pour le suivi d'un phénomène très versatile comme la réaction gliale. Une modalité idéale ne perturbe pas l'organisme, autorise des mesures répétées, et donne une information spécifique, localisée et quantitative. Cette partie rappelle le développement du [¹¹C]PK1115 comme radiotraceur de l'activation microgliale pour la tomographie d'émission de positons (TEP).

2-1) Le récepteur périphérique aux benzodiazepines (PBR) et ses ligands

Le récepteur périphérique aux benzodiazepines (PBR) doit son nom à la mise en évidence d'une liaison spécifique de la benzodiazepine diazepam dans le rein, en plus de sa liaison aux récepteurs centraux du SNC (CBR) (137). Le CBR fait partie du canal ionique récepteur du neurotransmetteur GABA, situé à la membrane neuronale, et sa liaison au diazepam est déplacée par le clonazepam. Le PBR est situé sur la membrane externe mitochondriale des cellules gliales (138), et sa liaison au diazepam est déplacée par le 4'-chlorodiazepam (Ro5-4864) (139). Ces deux sites de liaison des benzodiazepines sont en fait pharmacologiquement, anatomiquement, et structuralement distincts. La caractérisation du PBR a ensuite principalement bénéficié de l'introduction de ligands spécifiques de type isoquinoline carboxamide : le PK11195 (140, 141), et son dérivé nitré photoactivable, le PK14105 (142, 143) (fig. 12).

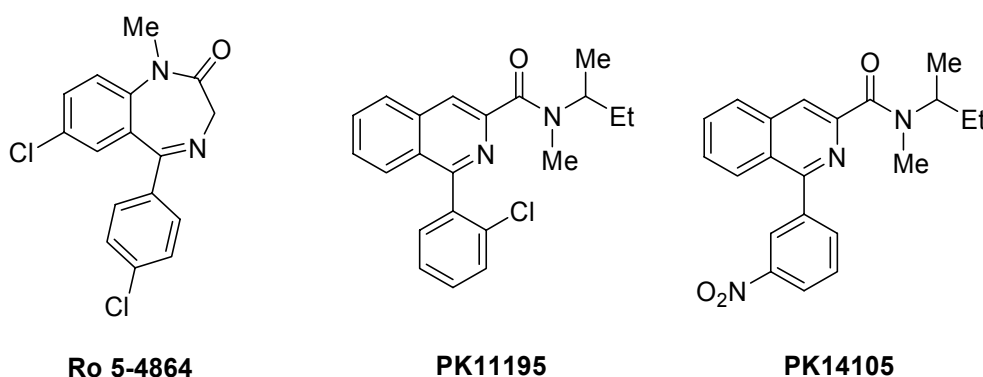


Figure 12. Structures chimiques des ligands du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) :
Ro 5-4864 (7-chloro-1,3-dihydro-1-méthyl-5(4V-chlorophényl)-2H-1,4-benzodiazépine-2-one) ;
PK11195 (1-(2-chlorophényl)-N-méthyl-N-(1-méthyl-propyl)-3-isoquinoline carboxamide) ;
PK14105 (1-(3-nitrophényl)-N-méthyl-N-(1-méthyl-propyl)-3-isoquinoline carboxamide).

L'autoradiographie quantitative et/ou les expériences de liaison sur homogénats utilisant le [³H]PK11195 ou le [³H]Ro5-4864 ont largement documenté i) la très faible quantité de sites de liaison dans des conditions normales, excepté l'épendyme ventriculaire au niveau des plexus choroïdes et le bulbe olfactif des rongeurs (144), ii) l'augmentation du nombre des sites de liaison sans changement de l'affinité au niveau des zones de réactivité

gliale dans divers modèles neuropathologiques : lésions excitotoxiques et ischémie (145-147), trauma (148), gliome (149, 150), sclérose en plaques (151, 152), transection du nerf facial (153), encéphalite due au virus simien d'immunodéficience (154). Plus récemment, le [³H]PK11195 a été utilisé pour évaluer la tolérance à un implant cérébral synthétique (155, 156) ou cellulaire (157). De plus, Raghavendra Rao *et al.* ont vérifié dans des modèles d'ischémie et de trauma que la liaison augmentée de [³H]PK11195 s'accompagnait d'une transcription augmentée du gène du PBR (158, 159).

Parallèlement, Benavides *et al.* (160) ont très tôt confirmé ces données sur des échantillons tissulaires humains, révélant une liaison basale du [³H]PK11195 deux fois plus importante dans la matière grise que dans la matière blanche avec un fort signal associé aux plexus choroïdes, ainsi qu'aux plaques démyélinisées des patients sclérosés, à la pénombre de l'infarct des patients victimes d'un accident vasculaire cérébral (AVC), et à la tumeur, hors zone nécrotique, de patients décédés d'un astrocytome. Une densité augmentée de sites de liaison du [³H]PK11195 ou du [³H]Ro5-4864 a également été mise en évidence après une encéphalopathie hépatique (161), dans le cortex temporal et frontal de patients Alzheimer (162-164), dans le putamen et le cortex frontal de patients Huntington (165, 166), et dans l'hippocampe de patients épileptiques (167).

Le succès de la méthode repose sur la démonstration d'une corrélation entre l'augmentation de l'expression du PBR et la perte neuronale. Après une injection striatale excitotoxique, la mesure de la liaison du [³H]PK11195 s'est révélée être un index fiable (dépendance envers la dose), et plus sensible (variation significative) que celle des enzymes neuronales (168). Puis, la valeur de cet index a été démontrée pour des intoxications systémiques expérimentales (169-172), et dans différents protocoles d'ischémie (focale (173) et globale (174)), ce qui a ouvert la voie à une évaluation indirecte des traitements neuroprotecteurs (175).

D'autres travaux ont confirmé le potentiel de ce marqueur de substitution des dégâts neuronaux pour la localisation de lésions ischémiques secondaires (145, 176), la détection précoce de la démyélinisation (177), et même l'évaluation des séquelles cognitives après un empoisonnement neurotoxique (soman, dérivés amphétaminiques) (178).

La sonde photoactivable [³H]PK14105 a permis la purification d'une unité membranaire de 18kDa (179, 180) : le terme PBR fait en général référence à cette seule sous-unité, dont la structure prédite est celle d'une protéine à 5 domaines transmembranaires, et qui fait partie d'un complexe multimérique comprenant au moins les unités VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*), et certainement d'autres protéines associées (PRAX-1 (*PBR-associated protein 1*) et PAP7 (*PBR and kinase A regulatory subunitR1a-Associated Protein*)). L'association de ce complexe avec le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), dont l'ouverture régule la perméabilité mitochondriale, est toujours discutée (181).

Le gène codant pour cette unité de 18kDa apparaît très conservé, et est exprimé dans de nombreux tissus, la plus forte expression étant trouvée dans les glandes surrénales, puis les reins, le cœur, les testicules, les ovaires et l'utérus. La localisation mitochondriale serait prédominante, mais loin d'être exclusive (182). Par ailleurs, les embryons dont l'expression du PBR est inactivé meurent précocement. Tout ceci suggère un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire (« *housekeeping gene* »), et de multiples fonctions ont été logiquement attribuées au PBR.

La plus documentée à ce jour est la biosynthèse stéroïdienne, dont la première étape, consistant en la translocation du cholestérol, avant sa transformation en prégnolone par l'enzyme P-450_{scc}, serait le fait du PBR (183) (fig. 13). Les autres fonctions attribuées au PBR (notamment immunomodulation, respiration cellulaire) pourraient en découler. Un groupe de chercheurs (184) a récemment fait la synthèse des connaissances sur le PBR, déjà désigné sous bien d'autres noms (*mitochondrial benzodiazepine receptor*, *mitochondrial diazepam-binding inhibitor (DBI) receptor complex*, *isoquinoline-binding protein (IBP)*, *peripheral benzodiazepine binding site (PBBS)*, *ω3 receptor*), et proposé l'abandon du terme historique pour le nouveau nom de *Translocator Protein 18 kDa (TSPO 18kDa)* afin de refléter au mieux sa fonction. « PBR », encore bien établi, sera néanmoins utilisé tout au long du texte.

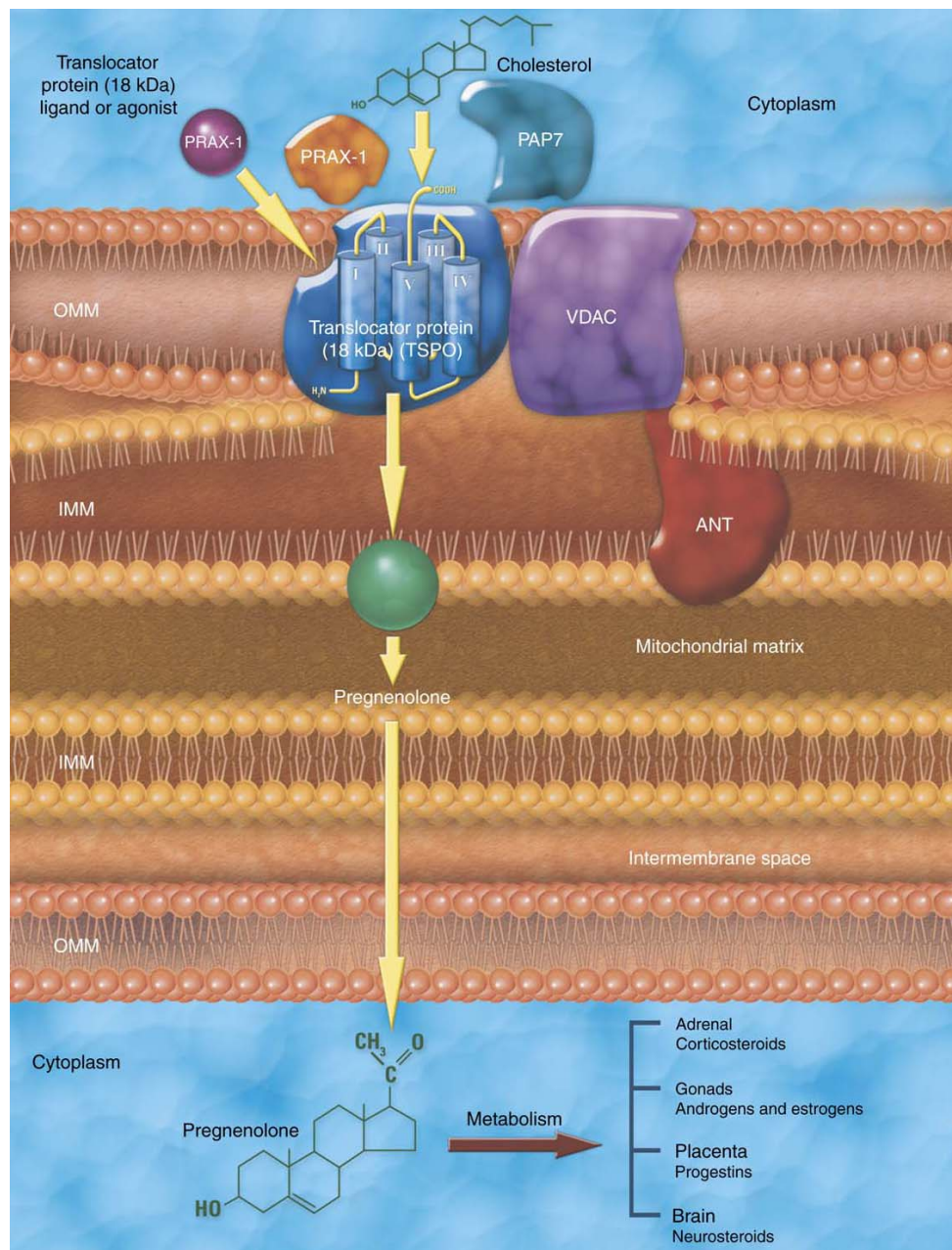


Figure 13. Modèle pour le transport du cholestérol à travers la membrane mitochondriale, et la biosynthèse stéroïdienne (extraite de Papadopoulos *et al.*, 2006 (184))

Le transport du cholestérol, envisagé comme étape limitante de la synthèse des stéroïdes, donne un cadre intéressant mais insuffisant pour interpréter les effets observés des ligands du PBR. *In vitro*, un test d'activité des ligands du PBR consiste à mesurer l'accumulation de prégnolone. De ce point de vue, le Ro5-4864 est clairement un agoniste alors que différents résultats sont rapportés pour le PK11195 : selon le protocole et le type cellulaire utilisés, il est capable de stimuler la formation de prégnolone de manière identique au Ro5-4864 (185, 186), ou bien il est sans effet et supprime cette stimulation provoquée par d'autres ligands du PBR (187, 188). En lien avec sa participation éventuelle à la formation du mPTP, des effets protecteurs envers le stress oxydatif et l'ischémie/reperfusion au niveau cardiaque ont été documentés *in vitro* et *in vivo* (189).

Plus récemment, une action anti-inflammatoire a été mise en évidence (190, 191), associée, dans le cas du SNC, à une action neuroprotectrice (192). Là encore, des résultats différents sont obtenus suivant les modèles, avec tantôt un effet du Ro5-4864 sans effet du PK11195 (modèle acide kainique (193)), tantôt un effet du PK11195 sans effet du Ro5-4864 (modèle lipopolysaccharide (194)). Cela suggère une combinaison d'effets direct et indirect de ces ligands sur l'activation gliale, dont le résultat diffère selon l'ampleur de la perte neuronale.

Par ailleurs, ces composés ont démontré une action pharmacologique dans un certain nombre de modèles comportementaux pré-cliniques : le Ro5-4864 est anxiogène et convulsant, alors que le PK11195 a des effets anxiolytiques et anti-convulsant (182). Leur mode d'action est là encore, discuté (195, 196) : elle peut être expliquée par un site de liaison de faible affinité au niveau du canal ionique des CBR (197, 198), ou elle peut être reliée à la stimulation de la synthèse des neurostéroïdes et à la modulation du CBR par l'allopregnanolone (fig. 14) (199), une hypothèse séduisante qui établit un lien entre le rôle du PBR dans le transport du cholestérol et des effets fonctionnels, anxiolytiques et/ou neuroprotecteurs, dépendant du statut stéroïdien (200).

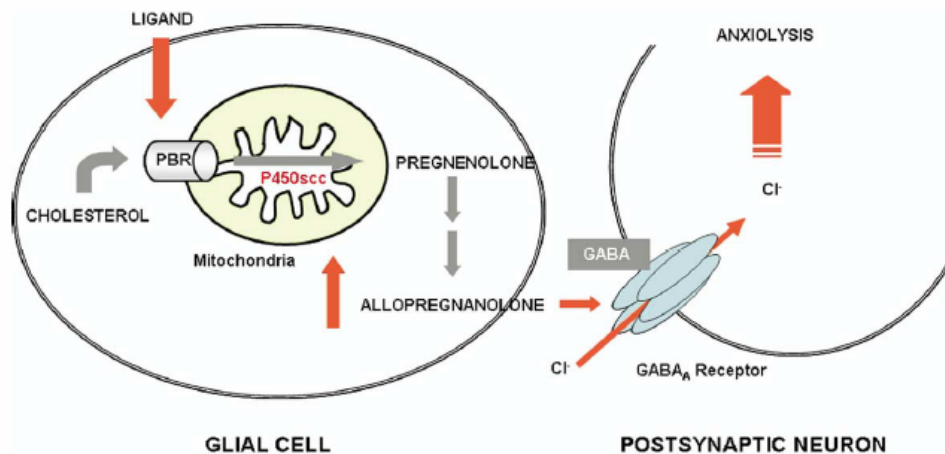


Figure 14. Mécanisme supposé de l'effet anxiolytique des ligands PBR, extrait de Papadopoulos *et al.* (2006) (199) : la modulation allostérique du récepteur GABA_Aerqique au niveau neuronal serait un effet indirect de la régulation de la biosynthèse stéroïdienne au niveau glial, au contraire des benzodiazepines qui agissent directement sur le canal ionique.

Enfin, la baisse de l'expression plaquettaire et leucocytaire du PBR est une donnée cliniquement établie dans un vaste répertoire de troubles de l'humeur (anxiété, schizophrénie, réponse au stress), et reflète certainement un mécanisme d'adaptation neuroendocrinien (182). La variation concomitante de l'expression au niveau cérébral a été très peu étudiée (201).

Le lien entre ces différents niveaux d'observation (stimulation de la biosynthèse stéroïdienne, expression cellulaire centrale et périphérique et effets pharmacologiques comportementaux) est à ce jour largement incompris, et susceptible de différer suivant la nature chimique du ligand considéré, dont les sites de liaison ne se recouvrent pas totalement (202, 203). Cependant, il existe de manière indiscutable un fort potentiel thérapeutique pour les ligands du PBR.

Leur potentiel diagnostique a quant à lui été très tôt entrevu d'après les résultats obtenus en autoradiographie, et les études de biodistribution (204-206). Le marquage des ligands Ro5-4864 (207) et PK11195 (208) par des radioisotopes a fourni un outil novateur à l'imagerie nucléaire cérébrale.

2-2) Tomographie d'émission de positons

La tomographie d'émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive et quantitative. Elle consiste en une injection d'une dose traceuse d'une molécule radiomarquée (radiotraceur), dont le trajet dans l'organisme et la concentration locale sont suivis au cours du temps. La nature physique du signal lui confère une haute sensibilité, particulièrement adaptée à l'étude des interactions moléculaires *in vivo* et à l'évaluation des paramètres pharmacodynamiques (biodistribution, pharmacocinétique) de nouveaux agents thérapeutiques. Les informations obtenues concernent donc, typiquement, la densité d'expression d'un récepteur, l'activité d'une enzyme, la biodistribution d'un médicament.

Les radionucléides utilisés en TEP (tab. 1) sont artificiels – donc produits dans un cyclotron –, de courte période, et ils émettent un positon au cours de leur désintégration de type β^+ . Beaucoup de ces émetteurs de positons sont des isotopes d'atomes de faible masse atomique, composant la matière organique. Cela signifie qu'il est possible de faire l'imagerie d'un biomarqueur isotopique en utilisant une molécule de composition chimique réellement identique à celle de la biomolécule. Les isotopes produits en cyclotron sont obtenus sous des formes chimiques relativement simples, telles que $^{11}\text{CO}_2$, ou H^{18}F . Avant leur injection au sujet, ils doivent donc être chimiquement incorporés à la molécule dont on veut suivre le devenir dans un organe. Cette synthèse radiochimique doit être rapide, en raison de la période des isotopes, et sélective, la molécule désirée devant être isolée, purifiée, rendue stérile et apyrogène avant injection au sujet.

| Radionucléide | Période (min) | Désintégration β^+ (%) | Energie cinétique maximale du positon (keV) | Libre parcours moyen dans l'eau (mm) | Energie du rayon γ détecté (keV) | RAS théorique (Ci/ μmol) |
|-----------------|---------------|------------------------------|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| ^{11}C | 20,4 | 99 | 981 | 1,12 | 511 | 9 215 |
| ^{13}N | 10,0 | 99 | 1190 | 1,44 | 511 | 18 430 |
| ^{15}O | 2,07 | 100 | 1723 | 2,22 | 511 | 90 960 |
| ^{18}F | 109,8 | 97 | 634 | 0,60 | 511 | 1 712 |

Tableau 1. Radionucléides émetteurs de positons de courte période. La radioactivité spécifique (RAS) est la radioactivité par unité de masse du radionucléide pur. Elle est inversement proportionnelle à la période.

Le positon émis par l'isotope radioactif perd progressivement son énergie cinétique par interaction avec la matière. Lorsque l'énergie du positon est presque nulle, il s'annihile

avec son anti-particule, l'électron. Ce sont les deux photons γ anti-parallèles de 511 keV émis lors de cette annihilation qui sont détectés par la caméra, et constituent la « matière » du signal observé en TEP (fig. 15a) . Le lieu d'émission du positon et le point d'annihilation ne sont pas confondus : la distance moyenne qui les sépare dépend de l'énergie cinétique des positons au moment de leur émission et limite la résolution spatiale qui peut être obtenue.

Le tomographe est constitué d'une couronne de cristaux scintillants (détecteurs) qui détectent les photons d'annihilation (fig. 15b-c). La détection simultanée, dite en coïncidence, de deux photons indique qu'ils proviennent d'une annihilation qui s'est produite à l'intérieur du volume défini par l'ensemble de toutes les lignes droites reliant les deux détecteurs (fig. 15c). La détection est simultanée si les deux photons sont enregistrés dans un intervalle de temps, appelé fenêtre de coïncidence, déterminé par l'électronique de comptage. Cette simultanéité joue le rôle d'une collimation électronique, et les dispositifs TEP n'ont pas besoin d'être équipés de collimateurs mécaniques pour sélectionner le volume dans lequel le positon a été émis. Sur les tomographe actuels la fenêtre de coïncidence varie entre 4 et 20ns.

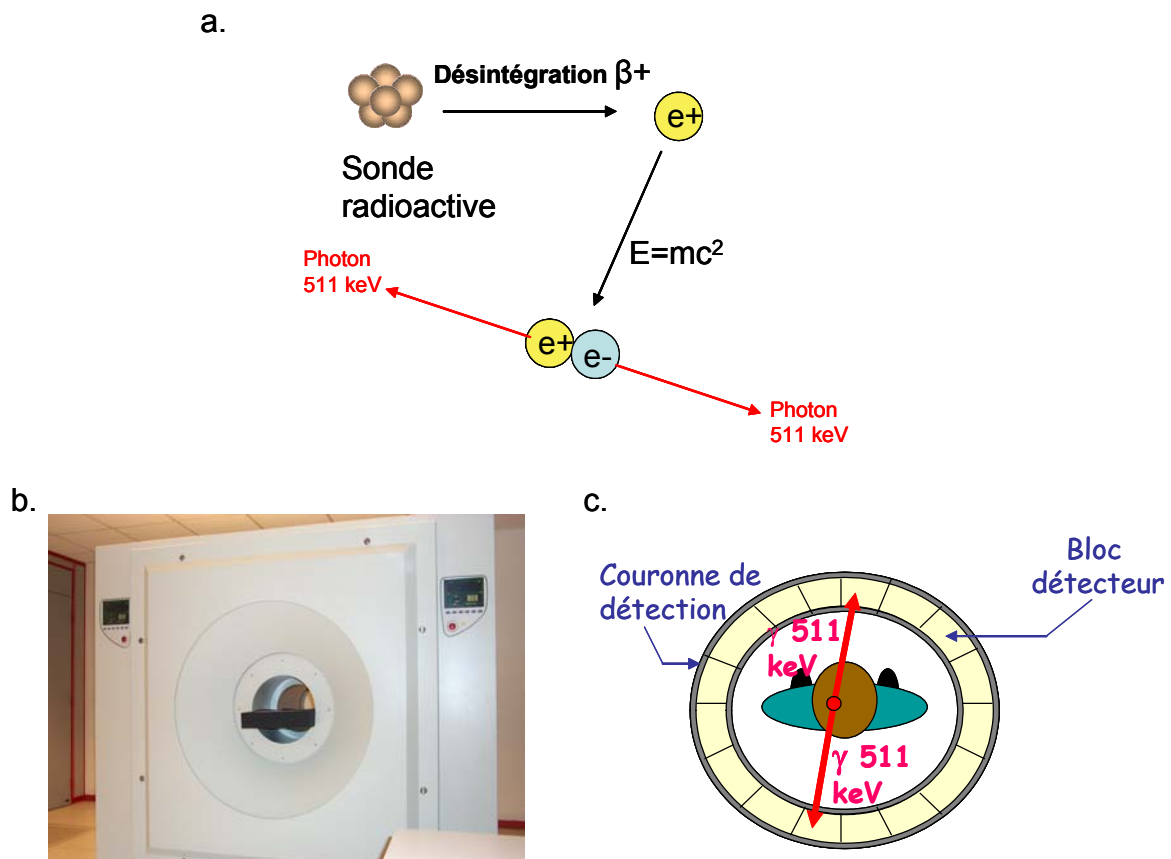


Figure 15. a. Représentation schématique de la désintégration β^+ donnant naissance, après annihilation du positon avec un électron, à deux photons de 511keV émis en direction opposée. b. Caméra TEP HRRT (CTI, Knoxville, TN, USA). c. Principe de la détection en coïncidence. L'intersection des lignes de coïncidence reliant les détecteurs opposés permet de définir la position d'une source d'émission. (Extrait de Pestourie, 2005 (209).)

La détection simultanée de deux photons qui proviennent de l'annihilation d'un même positon avec un électron de la matière et qui s'échappe du corps du sujet sans aucune interaction s'appelle une coïncidence vraie. Des événements « parasites » sont aussi détectés (fig. 16). Ainsi, des photons provenant de deux positons différents peuvent être détectés en

coïncidence, qui est dite fortuite ou aléatoire. Des photons peuvent diffuser de manière élastique sur des électrons de la matière (diffusion Compton). Lorsque l'un des deux photons d'annihilation subit cette interaction, une coïncidence dite diffusée peut avoir lieu. Dans ce cas, l'annihilation du positon est assignée à une position erronée. Enfin, si les photons s'échappent du corps avec une énergie inférieure à 511 keV ou sont absorbés dans le corps du patient, on parle d'atténuation. Cet effet est important puisque seuls 17% des couples de photons émis au centre du cerveau s'en échappent sans avoir interagi. Pour ces raisons, le traitement des images et leur reconstruction nécessitent une modélisation précise du lien entre l'objet à reconstruire et les données mesurées.

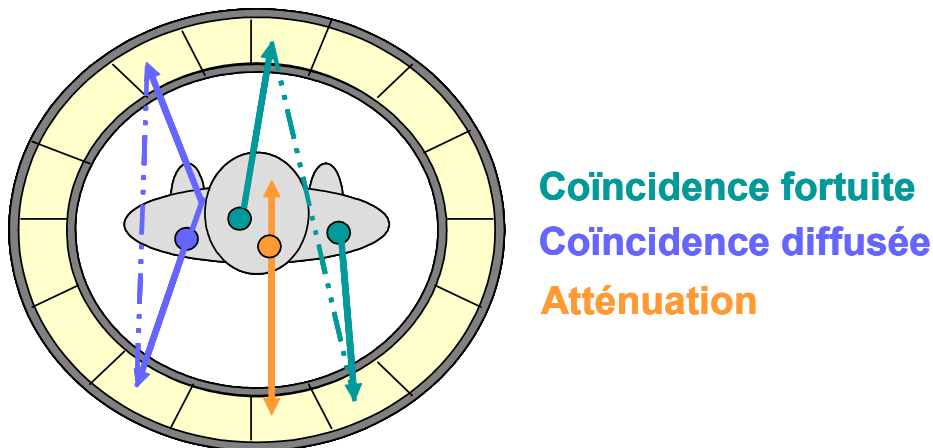


Figure 16. Schéma des événements parasites. Les lignes pointillées matérialisent les événements parasites perçus par la caméra comme des événements en coïncidence. En vert un exemple de coïncidence fortuite, les photons détectés en coïncidence proviennent de l'annihilation de deux positons. En bleu, une coïncidence diffusée, ici les deux photons détectés proviennent du même point d'annihilation mais la trajectoire d'un des deux a été déviée (diffusion Compton) dans ce cas l'annihilation du positon est assignée à une position erronée. En orange, un des deux photons a été absorbé dans le corps du patient, aucune détection ne peut être faite, on parle d'atténuation. (Extrait de Pestourie, 2005 (209).)

L'acquisition terminée, l'ensemble des événements détectés par le tomographe est traité par un algorithme (rétroprojection filtrée) corrigeant des événements radioactifs fortuits et rassemblant les événements acquis sous forme de projections multiples pour générer des images quantitatives de la radioactivité dans les tissus. En tant que méthode statistique tomographique, les images TEP intègrent les événements détectés sur une certaine durée, découpant en portions finies la dimension temporelle pour permettre une reconstruction tridimensionnelle.

Outre son coût, l'inconvénient majeur de la TEP tient à sa résolution spatiale très grossière, comparée à une méthode d'imagerie anatomique comme l'IRM. La résolution est intrinsèquement limitée par le libre parcours moyen des positons émis (tab. 1), mais elle est aussi fonction des algorithmes de reconstruction et des caractéristiques physiques du tomographe (géométrie des cristaux scintillants, nature des photomultiplicateurs). Concernant ces derniers points, les progrès technologiques et algorithmiques sont constants et les tomographes les plus performants pour l'imagerie corps entier chez l'homme (ou le primate non humain) ont aujourd'hui une résolution spatiale comprise entre 2,5 et 5 mm dans les trois directions de l'espace. Récemment, des tomographes plus résolutifs (jusqu'à 1,3 mm) ont été spécifiquement développés pour l'imagerie du petit animal (210) (fig. 17). Ceci représente une évolution capitale puisqu'elle rend la technique directement transférable de l'animal à

l'homme, donc susceptible d'accélérer considérablement le temps de développement d'un médicament ou d'un radiotraceur.

La tomographie d'émission de simple photon (TESP) est un dispositif moins coûteux, où un détecteur plan en rotation joue le rôle de la couronne de détecteurs de la TEP. Les isotopes utilisés sont des émetteurs γ – le plus courant est de loin le technétium métastable (^{99m}Tc) – de durée de vie plus longue et d'énergie plus faible que les émetteurs β^+ .

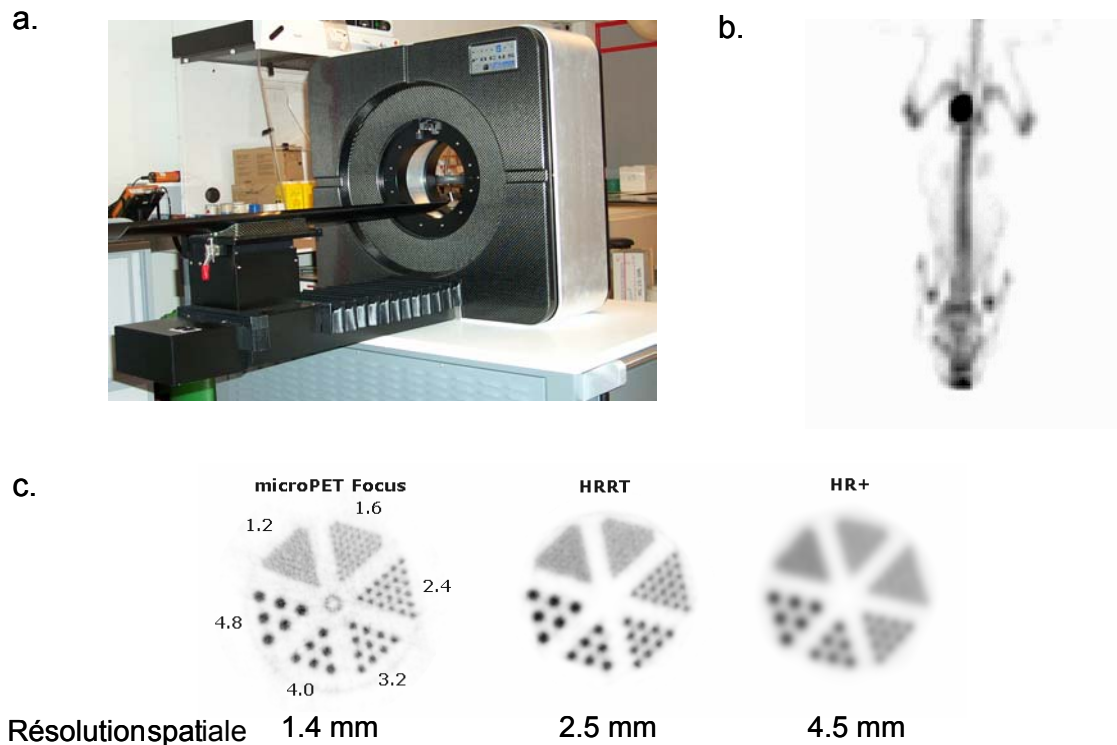


Figure 17. a. Exemple de caméra TEP dédiée au petit animal, microTEP Focus 220(CTI Concorde). b. Souris positionnée tête en bas ayant reçue une injection intraveineuse de 400 μCi de ^{18}FNa . Le fluor libre s'accumule dans les os et est éliminé par voie urinaire (marquage de la vessie). c. Résolution respective de trois caméras – microTEP Focus 220, caméra HRRT dédiée à l'imagerie cérébrale clinique, et caméra HR+ dédiée à l'imagerie clinique corps entier –, estimée grâce au fantôme de Derenzo rempli de ^{18}F . (Extrait de Pestourie, 2005 (209).)

Outre les sondes métaboliques comme le 2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F FDG), ou l'eau (H_2^{15}O) ou le dioxygène (^{15}O) marqué, l'imagerie TEP en neurologie consiste essentiellement en la visualisation des récepteurs neuronaux par des ligands radiomarqués (211). Cette activité est à l'origine du développement de la modélisation compartimentale. En effet, une concentration locale à un instant donné représente non seulement une densité locale de récepteurs auxquels le radioligand est lié, mais aussi une fraction de radioligand sous forme libre, ou lié de manière non spécifique, ainsi qu'une contribution vasculaire circulante. La complexité augmente avec la formation *in vivo* de métabolites, c'est-à-dire de composés radioactifs issus de l'activité enzymatique de l'organisme. La modélisation a pour but de différencier ces sources potentielles de signal selon plusieurs compartiments (i.e. « pools biochimiques ») caractérisés par des constantes

cinétiques d'échange. Concrètement, un modèle étant déterminé *a priori*, il s'agit de déterminer les constantes cinétiques permettant de rendre compte des données expérimentales. Un modèle classiquement utilisé est celui à 3 compartiments ou 2 compartiments tissulaires (et un sanguin), représenté figure 18.

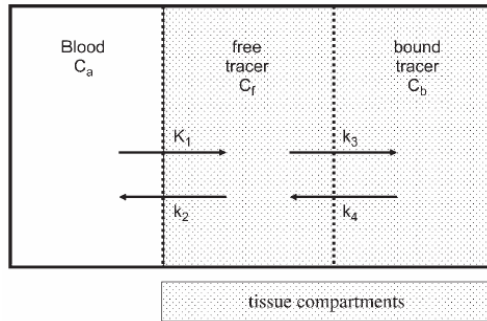


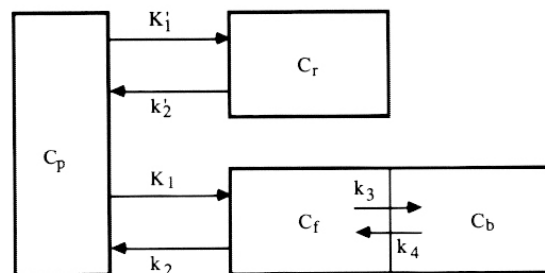
Figure 18. Modèle compartimental standard pour un radioligand. C_a , C_f et C_b représentent respectivement la concentration locale au cours du temps dans le plasma artériel et le tissu, sous forme libre et liée. K_1 à k_4 sont les constantes d'échange entre compartiments. (Extrait de Heiss, 2006 (211))

Le potentiel de liaison (*Binding Potential (BP)*), par analogie avec la situation d'expérience de liaison *in vitro*, définit le rapport des quantités de ligands lié sur libre (C_b/C_f), et correspond au rapport du nombre maximal de sites de liaison spécifiques sur la constante de liaison (B_{max}/K_d). L'hypothèse fréquemment utilisée d'une liaison non spécifique constante entre compartiments permet de définir BP comme le rapport k_3/k_4 (211).

Cependant, la résolution complète du système d'équations dérivé de ce modèle requiert en plus des données d'imagerie, la courbe de concentration plasmatique du traceur, ou fonction d'entrée plasmatique. Cela nécessite des prélèvements artériels laborieux pour une utilisation routinière. D'où l'introduction de modèles avec région/tissu de référence, supposée dénuée de récepteur spécifique du radioligand (fig. 19).

Le modèle simplifié avec tissu de référence (*Simplified Reference Tissue Model (SRTM)*) correspond au cas où le compartiment tissulaire dans la région de référence contient uniquement le ligand libre et celui dans la région cible uniquement le ligand lié (ou en échange rapide avec le compartiment sanguin) (212). Sous l'hypothèse d'une liaison non spécifique de volume de distribution* égal dans les compartiments cible et de référence (soit $K'_1/k'_2 = K_1/k_2$), la résolution du système d'équations ne fait plus intervenir que 3 paramètres : R_1 ($= K_1/K'_1$), qui rend compte des différences de perfusion entre compartiments, k_{2a} , qui est une constante de vitesse apparente (liée à l'échange rapide) et le potentiel de liaison BP ($=k_3/k_4$).

Figure 19. Modèle compartimental avec région de référence. C_p , C_r , C_f et C_b représentent respectivement la concentration locale au cours du temps dans le plasma, le tissu de référence, et le tissu cible sous forme libre et liée. K_1 à k_4 sont les constantes d'échange entre compartiments. (Extrait de Lammertsma, 1996 (213)).



* Le terme de volume de distribution (V_d) représente le volume tissulaire dans lequel le traceur se distribuerait avec la même concentration que dans le sang. Mathématiquement, il est défini par le rapport des concentrations à l'équilibre dans le tissu et dans le sang, et est analogue à un coefficient de partition.

2-3) Imagerie de la neuroinflammation

Imagerie TEP de la neuroinflammation avec le [¹¹C]-(R)-PK11195

Les premières études d'imagerie *in vivo* chez l'homme utilisant [¹¹C]PK11195 ou [¹¹C]Ro5-4864 ont surtout concerné la détection de tumeurs cérébrales, et leur possible gradation sans recourir à une biopsie (214-216). L'échec de l'utilisation de [¹¹C]Ro5-4864 est expliqué par une liaison dépendante de l'espèce pour ce ligand, à la fois en terme d'affinité et de quantité de sites marqués (203, 217, 218).

Shah *et al.* (219) ont ensuite démontré que la rétention de l'énantiomère (R) était supérieure et dès lors, [¹¹C]-(R)-PK11195 s'est imposé comme le radiotracer PBR de référence, avec une affinité inférieure à 20 nM chez toutes les espèces testées. Il a été le seul ligand PBR utilisé chez l'homme jusqu'à ces dernières années. Plusieurs autres radioligands du PBR sont maintenant évalués cliniquement (cf partie A-4-2).

Cependant, la question de l'origine du signal dans le cerveau, c'est-à-dire, outre les monocytes/macrophages infiltrés, les contributions relatives des astrocytes et de la microglie activée sont toujours débattues (220). L'expression du PBR est observée sur les 2 types cellulaires en culture, et des procédures de microautoradiographie sur émulsion ont fourni des résultats contradictoires suivant les modèles neuropathologiques. De plus, le marquage immunohistochimique du PBR par un anticorps polyclonal ne recouvre pas totalement le marquage autoradiographique par le PK11195 tritié (221, 222). Pourtant, il est bien établi que l'accroissement local de signal est corrélé avec la présence de microglie activée et/ou de macrophages infiltrés, plutôt qu'avec celle d'astrocytes réactifs. *In vivo*, la contribution microgliale est reconnue comme majoritaire pour expliquer l'accroissement du signal par rapport à des conditions non pathologiques, et en l'absence de rupture de la BHE. La contribution astrocytaire apparaît faible, mais pourrait être non négligeable dans certains cas.

En conditions neuropathologiques, l'imagerie TEP cérébrale avec le [¹¹C]-(R)-PK11195 présente donc une bonne spécificité envers les cellules de la lignée myéloïde, qui sont les principaux acteurs cellulaires de la réaction inflammatoire au sein du parenchyme cérébral. Sur le plan strictement technique, il s'agit d'une avancée spectaculaire car la détection de l'activation microgliale a longtemps été circonscrite aux techniques post mortem de marquage immunohistopathologique, car les méthodes d'imagerie nucléaire traditionnellement utiles pour la détection de l'inflammation périphérique (marquage leucocytaire au ^{99m}Tc-HMPAO, utilisation d'anticorps humanisés) ne fournissent pas un signal cérébral suffisant. Ce traceur a de plus la particularité d'engendrer un contraste positif, contrairement à la plupart à des traceurs utilisés en neuro-imagerie, dont les images révèlent des déficits (de métabolisme, de récepteurs).

L'imagerie de la neuroinflammation, telle que définie par les images [¹¹C]-(R)-PK11195, est par essence une imagerie de la réaction gliale, utilisée comme marqueur indirect de souffrance/perte neuronale. Outre le suivi des neuropathologies typiquement associées à une réponse inflammatoire aiguë (ischémie/reperfusion) ou chronique (sclérose en plaques), elle présente un potentiel certain pour l'imagerie des pathologies neurodégénératives, dont l'évolution au long cours est caractérisée par des processus inflammatoires persistents (cf partie A-3). Un certain nombre d'interprétations, issues des études d'imagerie chez l'homme, ont été avancées (223) : le signal observé serait le marqueur générique d'une activité pathologique en cours, par opposition aux modalités d'imagerie anatomique (IRM, CT), dont

l'analyse morphométrique reflète des changements de volume consécutifs à la dégénérescence. D'où la possibilité d'utiliser cet outil pour un diagnostic précoce. Par ailleurs, outre la visualisation d'une lésion primaire, quelque soit sa cause, une activation microgliale distante est parfois détectée : elle marquerait la réponse antérograde, rétrograde, ou trans-synaptique, en parallèle avec les voies nerveuses affectées. Ceci ouvre la voie, selon le rôle jouée par la microglie activée, à la détection de processus de dégénérescence wallérienne, comme de plasticité neuronale.

En l'état actuel des connaissances, le marquage des cellules microgliales activées est associé à une augmentation de l'expression mitochondriale du PBR et/ou du nombre de mitochondries sans changement d'affinité. On ne connaît pas les conséquences métaboliques de cette augmentation au niveau mitochondrial ou cellulaire (hormis le lien possible avec la biosynthèse stéroïdienne évoqué auparavant). Elle semble refléter un processus d'activation générique, bien différencié de l'état quiescent, mais une hétérogénéité du marquage a parfois été notée, et une association avec la phagocytose des érythrocytes après ischémie est suggérée (222). En règle générale, le marquage par le PK11195 ne renseigne pas sur le statut fonctionnel de la cellule activée et son rôle neuroprotecteur ou neurotoxique (224).

Autres radioligands et modalités d'imagerie non invasive pour l'inflammation

Si les cibles potentielles pour l'imagerie nucléaire de la neuroinflammation ne manquent pas (cf partie A-4-3), les développements restent pour l'instant limités, puisque la marquage d'inhibiteurs des enzymes COX (225-229) et NOS (230-233) a fourni des résultats de biodistribution décevants. L'incorporation de l'acide arachidonique radiomarqué est une approche originale, mais reflète essentiellement l'activité neuronale (234-236). Un groupe a exploré l'utilité du cobalt-55 comme analogue radioactif du calcium pour la visualisation des infarcts ischémiques, dont le marquage semble peu spécifique (237-241).

L'imagerie des transporteurs de la BHE (*P-glycoprotein* (P-gp), *Multidrug Resistance Protein* (MRP)) offre un moyen d'accéder à la perméabilité de la BHE. De nombreux radioligands ont été développés pour visualiser P-gp (242), dont le plus prometteur est le [¹¹C]-(*R*)-verapamil (243-245). L'intérêt de ce radiotraceur concerne surtout l'étude de la pharmacorésistance (246), même si des variations d'expression de P-gp pourraient jouer un rôle dans l'étiologie des maladies neurologiques (247).

Les chimiokines et interleukines radiomarquées sont des agents intéressants pour l'imagerie de l'inflammation (248). Ils représentent une alternative moins coûteuse et aussi efficace que les anticorps, avec de meilleures propriétés pharmacocinétiques du fait de leur plus petite taille. Mais ils sont avant tout destinés à l'imagerie TESP des zones inflammatoires périphériques. Leur évaluation est délicate car ils sont susceptibles d'avoir un effet pharmacologique à faible dose, et de provoquer une réponse immunitaire (249). L'IL-8 marquée au Tc, est aujourd'hui en évaluation clinique (250).

L'IRM possède évidemment de nombreuses applications en neuro-imagerie, s'appuyant sur une excellente résolution, et la possibilité de détecter l'activité neuronale (IRMf). La mesure locale de paramètres tels que les temps de relaxation (251), le tenseur de diffusion (252), ou le transfert de magnétisation (253) reste cependant difficilement attribuable à une source cellulaire spécifique et/ou difficilement interprétable. Le métabolisme

mesuré en MRS (ratio *N*-acetyl aspartate sur choline) reflète quant à lui la perte neuronale, indépendamment de l'activation gliale, et ce avec une sensibilité encore relativement faible. Les agents de contraste sont un atout décisif pour l'IRM, par la possibilité de concentrer localement un signal distinctif du reste du tissu. Le complexe intravasculaire Gd-DTPA est une évaluation non invasive efficace de la rupture de la BHE. Les nanoparticules de fer circulantes s'accumulent dans les macrophages recrutés suite à un infarctus du myocarde (254) ou un accident vasculaire cérébral (255). Mais cibler une population cellulaire spécifique requiert en général la fonctionnalisation de ces agents de contraste. Les preuves de ce concept sont établies pour l'imagerie de l'endothélium activé (sélectines (256, 257), molécules d'adhésion (258, 259)). L'IRM est donc en mesure d'apporter des informations complémentaires à l'activation microgliale visualisée en TEP via le PBR. Les agents de contraste magnétiques autorisent des durées d'accumulation de plusieurs heures, alors que le radioligand archétypique est une petite molécule organique à la pharmacocinétique rapide. Le recul manque pour apprécier à sa juste valeur la spécificité, la sensibilité, et la valeur quantitative de ces agents de contraste fonctionnalisés.

L'imagerie ultrasonore s'est révélée être une alternative intéressante pour détecter l'activation endothéliale. Les agents de contraste sont des micro-bulles (liposomes d'enveloppe protéique, lipidique ou polymère remplies de gaz de carbone perfluoré), ayant une affinité « naturelle » pour les neutrophiles et leucocytes (260), et pouvant être fonctionnalisés (261, 262). Ils sont éventuellement phagocytés tout en restant acoustiquement actifs, donc détectables (263). La technologie SPAQ (Sensitive Particle Acoustic Quantification), récemment décrite (264), permet d'obtenir une quantification de la concentration locale d'agent de contraste avec une résolution théorique micrométrique. L'imagerie des ganglions lymphatiques grâce à un anticorps anti-sélectine L (265), et l'imagerie de ICAM-1 dans un modèle de sclérose en plaques (266) ont apporté la preuve de concept nécessaire. Cette modalité au coût beaucoup plus faible que la TEP et l'IRM pourrait prendre une part importante dans la diffusion des méthodes innovantes issues de l'imagerie moléculaire et bénéficier à la vectorisation thérapeutique.

3) Neuropathologies et neuroinflammation

Les données expérimentales indiquant l'augmentation du PBR dans des conditions neuropathologiques variées ont été résumées précédemment (partie A-2-1). Cette partie présente les études TEP employant le radioligand [¹¹C]-(R)-PK11195 réalisées chez l'homme. Chaque section inclut une brève présentation de la pathologie et de l'implication prouvée ou suspectée de phénomènes inflammatoires. Les modalités d'imagerie non invasive utiles à la prise en charge de ces pathologies sont mentionnées, et le potentiel de l'imagerie TEP par le [¹¹C]-(R)-PK11195 est discuté au regard des données disponibles.

3-1) Maladie d'alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la pathologie neurodégénérative la plus fréquente (prévalence globale entre 5 et 10% pour les plus de 65 ans, avec évolution exponentielle après 75 ans), et la première cause de démence (65-70% de l'ensemble) (267). Celle-ci est progressive, d'étiologie inconnue, et caractérisée par 2 types de marqueurs histopathologiques permettant d'établir un diagnostic post mortem : les dépôts extracellulaires de peptide amyloïde- β (plaques amyloïdes) et les dépôts intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée (dépôts neurofibrillaires) (268). L'analyse des rares formes familiales de maladie d'Alzheimer et de démence fronto-temporale a mis en évidence des mutations des gènes des présénilines (PS), du précurseur de la protéine amyloïde (APP), et de la protéine tau associé aux microtubules (MAPT) qui ont servi de base à l'établissement de nombreux modèles murins transgéniques (269).

Une hypothèse centrale pour la compréhension de la maladie est celle de la cascade (protéine β -amyloïde, qui considère l'accumulation de cette protéine sous ses diverses formes (soluble, insoluble) comme le déclencheur d'une cascade neurotoxique (270). L'approche d'immunisation active avec le peptide β -amyloïde repose sur cette hypothèse, et a été testée avec succès sur des modèles de souris transgéniques (271), avant de montrer des effets secondaires graves (méningo-encéphalites) lors d'un essai clinique (272).

La prééminence de processus inflammatoires est largement documentée par la présence de protéines (système du complément, cytokines, protéines d'adhésion, de phase aiguë, molécules MHC de classe II) et de microglie activée agrégées aux plaques β -amyloïdes dans le cerveau des patients (273, 274), signe d'une activation gliale sans infiltration leucocytaire massive, ni inflammation systémique avérée. D'autre part, l'effet protecteur des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisés à long terme est une donnée épidémiologique bien établie, mais mal comprise du point de vue mécanistique (275, 276). Cette donnée est pourtant à la base de l'hypothèse inflammatoire de la maladie d'Alzheimer, qui désigne une réponse inflammatoire auto-entretenu comme directement responsable de la perte neuronale, et force motrice de la pathologie (72, 277). Le corollaire de cette hypothèse est une activation microgliale précoce, qui précède la symptomatologie clinique.

Récemment, l'identification de cellules microgliales dystrophiques a conduit Streit à proposer l'hypothèse alternative du dysfonctionnement microglial comme contribution potentielle importante au développement de la maladie (120).

La manipulation génétique de l'inflammation associée aux dépôts amyloïdes (sur-expression de COX-2, de TGF- β , de MCP-1, activation du complément, inactivation de CD40L, ... dans des modèles transgéniques d'accumulation de plaques amyloïdes) révèle selon les cas un effet bénéfique ou néfaste qui montre bien l'hétérogénéité de la réaction microgliale sous l'influence permanente de déterminants multiples (fig. 20).

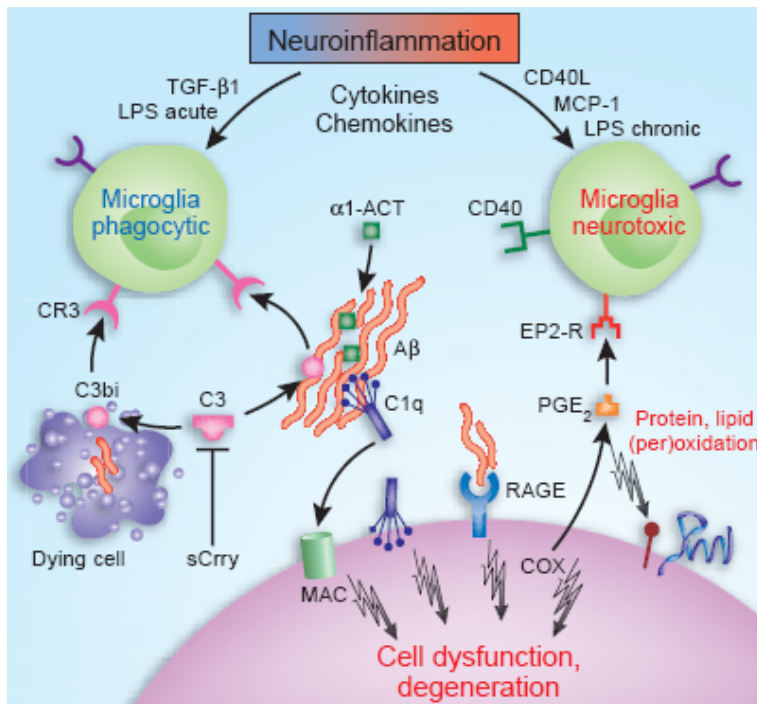


Figure 20. Schéma résumant les résultats des études génétiques de la neuroinflammation chez les souris APP, extrait de Wyss-Coray, 2006 (276).

La pathologie humaine ajoute une dimension temporelle importante, puisque les changements neuropathologiques s'étendent sur une période symptomatique et pré-symptomatique de plusieurs dizaines d'années. Les études histopathologiques menées par plusieurs groupes montrent une activation microgliale associée aux dépôts amyloïdes insolubles marqués par le rouge Congo relativement précoce. Cette activation précéderait le stade de forte accumulation de dépôts neurofibrillaires et la symptomatologie clinique (278). Elle a été démontrée dans certains modèles murins (279).

L'imagerie non-invasive des plaques amyloïdes a donc fait l'objet d'intenses efforts de recherche (280, 281). La détection directe des plaques par IRM ou RMS restera probablement limitée aux modèles animaux (282), et l'emploi d'agents de contraste magnétiques requiert une ouverture pharmacologique transitoire de la BHE (283). Les autres modalités utilisent un marquage spécifique des dépôts amyloïdes par des composés dérivés du rouge Congo ou de la thioflavine S, utilisés depuis longtemps en histologie : imagerie multi-photonique (284), de fluorescence (285), IRM du fluor 19 (286), et imagerie nucléaire, directement transférable à l'homme. Ainsi, parmi les 4 radiotraceurs déjà étudiés cliniquement, le [^{11}C]PIB s'est imposé comme le radiotraceur spécifique des plaques amyloïdes le plus prometteur (287), et constitue un outil d'étude novateur des mécanismes pathophysiologiques à l'œuvre dans les stades assez précoces de la maladie (288).

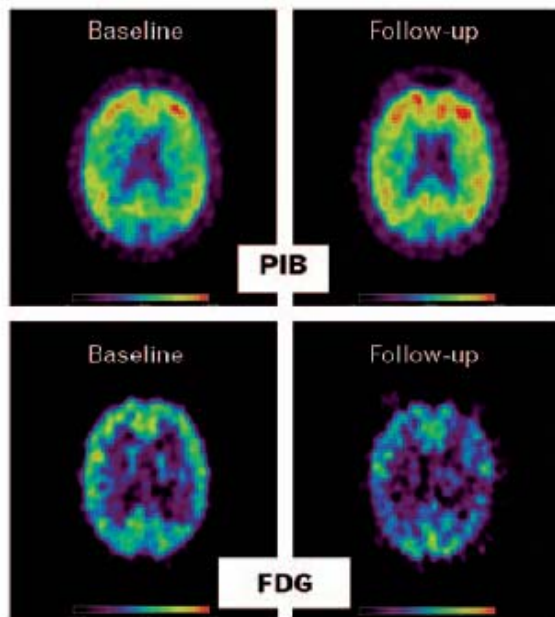
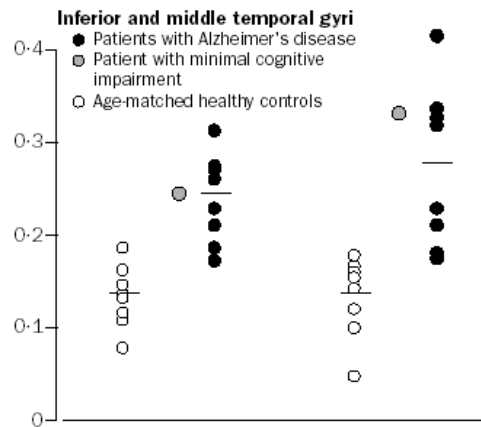


Figure 21. Changements à 2 ans d'intervalle de la rétention du [^{11}C]PIB (relativement stable) et du [^{18}F]FDG (largement diminuée) chez un patient Alzheimer, qui se sont accompagnés de la détérioration de ses capacités cognitives. Il semblerait que la charge amyloïde atteigne un plateau avant le déclin du métabolisme cérébral. (Extrait de Nordberg, 2007 (287).)

Cependant, sa valeur diagnostique et prédictive envers les patients Alzheimer et ceux atteints de déficit cognitif moyen (MCI), de démence à corps de Lewy, ou de dégénérescence du lobe frontotemporal (FTLD), en comparaison avec le [^{18}F]FDG (fig. 21), les marqueurs du CSF, ou les tests cognitifs reste à démontrer (289-291). Bien que les images soient interprétables visuellement (292), une méthode de quantification simple, robuste et largement acceptée fait encore défaut pour tirer la pleine mesure de la méthode. La lipophilicité du ligand et la présence de 2 sites de liaison corticaux distincts requièrent une modélisation compartimentale complète avec fonction d'entrée plasmatique, une procédure fastidieuse et source d'erreur. Le radiomarquage au carbone 11 est également une limitation à une large diffusion clinique du traceur. En conséquence, plusieurs groupes évaluent actuellement des analogues fluorés du PIB (293-295).

L'imagerie de la réaction gliale avec le [^{11}C]PK11195 a également été réalisée chez l'homme. La première étude, réalisée sur 8 patients, n'avait pas montré de rétention du radiotracer, alors que des régions hypométaboliques corticales étaient visibles (296). La seconde étude a bénéficié d'avancées technique (TEP en mode dynamique 3D), radiochimique (utilisation de l'énantiomère *R*), et analytique (quantification avec fonction d'entrée plasmatique), et mis en évidence une tendance à l'accroissement de la liaison dans plusieurs régions liées à la pathologie (cortex entorhinal, temporopariétal (fig. 22) et cingulaire), ainsi que dans le thalamus (297). Les auteurs ont noté une association intéressante entre les zones de rétention du traceur et l'atrophie détectée dans les 2 années suivantes par IRM volumétrique. Une troisième étude a utilisé l'imagerie TESP et le traceur [^{123}I]iodo-PK11195, selon une approche semi-quantitative (298). Elle a confirmé une liaison augmentée dans plusieurs régions corticales. Les faibles effectifs engagés dans ces études, et les fortes variations individuelles observées ne permettent pas de conclure sur l'utilité réelle de la méthode pour le diagnostic précoce de la maladie. Cependant, un motif d'activation différent a été rapporté sur un groupe de patients atteints de dégénérescence du lobe fronto-temporal (299, 300).

Figure 22. BP du [^{11}C]PK11195 mesurés dans le cortex temporal chez des patients Alzheimer, chez un patient souffrant de troubles cognitifs, et chez des sujets sains. Cette zone cérébrale correspond à la différence la plus importante entre les 2 groupes. (Extrait de Cagnin *et al.*, 2001 (297).)



Comparé aux radioligands des plaques amyloïdes, les radioligands du PBR ont l'avantage d'un accès potentiel à la dynamique cellulaire de la neuroinflammation, dont la modulation est une voie thérapeutique d'intérêt. L'imagerie de la neuroinflammation pourrait donc à l'avenir fournir des marqueurs plus fiables et plus réactifs que les tests cognitifs pour l'évaluation thérapeutique, alors que la nature de la forme amyloïde toxique (amyloïde soluble, agrégats diffus ou plaques insolubles, ces dernières étant seules marquées par le PIB (301)) est toujours discutée.

3-2) Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative progressive, dont la prévalence est estimée à 0,1%. La dégénérescence est spécifique des neurones dopaminergiques nigrostriés, mais les symptômes cliniques (tremblements, rigidité) n'apparaissent qu'après la perte de la moitié des neurones de la substance noire, ce qui correspond à une concentration de dopamine réduite de 80% dans le striatum (302, 303). Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer le mécanisme de perte neuronale sélective dans la forme sporadique de la maladie : intoxication environnementale, stress oxydatif, dysfonction mitochondriale. L'hypothèse « protéolytique », en lien avec les gènes impliqués dans les rares formes familiales (parkin, ubiquitin, α -synucléine), explique la formation d'inclusions intra-cytoplasmiques caractéristiques (corps de lewy) par une altération de la voie de dégradation des protéines ubiquitine-protéasome (304).

Ces dernières années, la contribution possible des cellules microgliales activées à la mort neuronale a reçu une attention considérable (305-309). Celles-ci, ainsi que des astrocytes réactifs exprimant la molécule d'adhésion ICAM-1, et des niveaux élevés de médiateurs inflammatoires (cytokines, COX-2, iNOS, complément) sont présents dans le striatum des patients. L'intoxication par le MPTP (methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), qui inhibe la respiration mitochondriale, reproduit les symptômes parkinsoniens par la destruction des neurones dopaminergiques, et conduit à une activation durable de la microglie. Les modèles animaux, basés sur l'emploi de neurotoxiques – MPTP, 6-OHDA (6-hydroxydopamine), rotenone (un pesticide) – ont confirmé la persistance d'une réaction inflammatoire, dès lors suspectée de contribuer à la progression de la maladie, quelque soit la nature du stimulus

déclencheur. Comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, des études épidémiologiques ont rapporté une réduction, inexpliquée, du risque de développer la maladie par les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens (310).

Sur le plan de l'imagerie, la maladie de Parkinson bénéficie des traceurs spécifiques du système dopaminergique (311, 312) : la [^{18}F]F-DOPA en PET, et le [^{123}I]β-CIT en TESP (DOPASCAN ou *DAT-SCAN*, pour *Dopamine Transporter scan*) montrent un déficit présynaptique asymétrique, plus important dans le putamen que dans le noyau caudé, vraisemblablement détectable avant l'apparition des symptômes (fig 23). La localisation du transporteur de la dopamine est un marqueur sensible et spécifique de l'intégrité des neurones dopaminergiques (313).

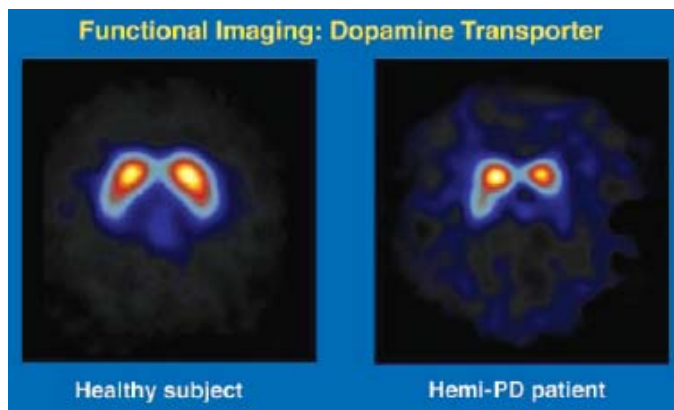


Figure 23. Images TESP du radioligand du transporteur de la dopamine [^{123}I]β-CIT (2β-carboxymethoxy-3β(4-iodophenyl)tropane) chez un sujet sain et un patient présentant des symptômes parkinsoniens du côté droit. La perte est asymétrique, plus prononcée dans le putamen que dans le noyau caudé. (Extrait de DeKosky et Marek, 2003 (311))

Par ailleurs, une altération de la BHE dans le mésencéphale a été détectée *in vivo*, grâce au [^{11}C]-verapamil, et soutient l'hypothèse d'un facteur toxique environnemental (314).

Le [^{11}C]PK11195 pourrait être utile à la sélection de patients aux stades présymptomatique ou précoce de la maladie pour l'évaluation de thérapies (315). En effet, une première étude avec 10 patients n'ayant pas reçu de traitement a suggéré l'existence de corrélations intéressantes entre le potentiel de liaison du [^{11}C]PK11195 dans le mésencéphale et celui du [^{11}C]-CFT (dopamine transporteur) dans le putamen, ainsi qu'avec les déficits moteurs (échelle UPDRS [*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*]) (316). Cette étude confirmait chez l'homme des résultats obtenus dans des modèles animaux (injection intrastriatale de 6-OHDA visualisée avec [^{11}C]PK11195 (317)) ou intoxication systémique au MPTP caractérisée avec [^3H]PK11195 (172)). Une seconde étude a révélé une augmentation du potentiel de liaison du [^{11}C]PK11195 très diffuse (fig. 24), touchant le striatum, le thalamus, le le mésencéphale et plusieurs aires corticales, sans relation avec les déficits moteurs, et sans différence significative au niveau de la substance noire (318). De plus, la distribution cérébrale du radiotracer n'a pas évolué lors d'un suivi longitudinal sur 2 ans, alors que l'état des patients se détériorait et que la fixation de [^{18}F]F-DOPA était réduite. Selon les auteurs, la distribution des sites de liaison du [^{11}C]PK11195 s'accorde avec celle des corps de Lewy, mais ne reflète pas la sévérité des déficits. Gerhard *et al.* ont également retrouvé une liaison diffuse du [^{11}C]PK11195 dans d'autres syndromes de type parkinsonien (atrophie multisystématisée (319), dégénérescence cortico-basale (320), paralysie supranucléaire progressive (321)). Pourtant, les données immunohistochimiques confirme une activation microgliale diffuse mais relèvent une faible association avec les corps de Lewy (322).

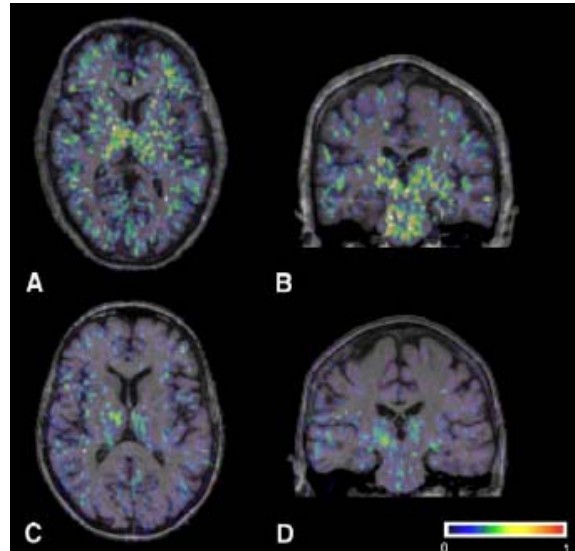


Figure 24. Images paramétriques du BP du $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ recalées sur l'image IRM correspondante. (A,B) Patient parkinsonien. (C,D) Sujet sain. (Extrait de Gerhard *et al.*, 2006 (318).)

De telles contradictions entre études TEP peuvent s'expliquer par le recrutement d'un faible nombre de patients dans un état d'avancement variable de la pathologie, ainsi que par des différences méthodologiques dans la genèse des images paramétriques du potentiel de liaison (définition de la région de référence d'après un individu ou plusieurs). Elles imposent la prudence quant à l'interprétation de l'activation microgliale dans la maladie de Parkinson. D'autre part, la réaction gliale dans les modèles animaux est dose-dépendante, et reflète en général une inflammation aiguë (172), qui reproduit très imparfaitement la pathologie humaine.

3-3) Maladie de Huntington

Il s'agit d'une maladie neurodégénérative héréditaire, à transmission autosomale dominante. La chorée caractéristique apparaît vers 40 ans, du fait de la perte sélective des neurones épineux moyens du striatum, puis la maladie évolue vers une démence, quand les aires corticales sont atteintes. Elle fait partie des maladies à expansion de triplet, où le gène muté sur le chromosome 4 contient dans sa partie codante une expansion variable (>40) de triplets nucléotidiques CAG, conduisant à l'expression d'une protéine (huntingtine) enrichie en glutamines (323).

Cette mutation semble conférer une propriété toxique à la protéine, dont le signe est une inclusion intranucléaire séquestrant d'autres protéines (protéines HAP ou *Huntingtin Associated Proteins*) et inhibant leur fonction physiologique. Alternativement, la perte d'une fonction anti-apoptotique est suggérée(324).

Un marqueur génétique de la pathologie est donné par le diagnostic moléculaire, effectué par PCR, qui reste peu employé en l'absence de traitement de la maladie (325). L'imagerie non invasive peut fournir un marqueur d'état, renseignant sur le stade évolutif de la maladie (326). La mesure de l'atrophie striatale au scanner ou en IRM est aujourd'hui la méthode de référence (327), et pourrait être détectée dans la phase pré-symptomatique (328). En TEP, un hypométabolisme précoce est observé dans le noyau caudé, et la perte des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 striataux est détectée de manière présymptomatique,

puis corrélée dans certaines études à l'invalidité. En revanche, il n'y a pas de déficit pré-synaptique (329).

Une activation microgliale a été observée *in vitro* (330), et confirmée *in vivo* par une augmentation de la rétention du [¹¹C]PK11195 (331). Les différences avec les sujets témoins étaient significatives dans le striatum ainsi que dans le cortex frontal et pariétal, mais les deux groupes étaient plus clairement différenciés par la fixation diminuée du [¹¹C]raclopride, radioligand des récepteurs dopaminergiques. Le même groupe a relevé cette variation parallèle de la liaison striatale des 2 radiotraceurs au stade pré-symptomatique (332), suggérant que l'activation microgliale, quelque soit son rôle exact dans la maladie d'Huntington, est un événement précoce, éventuellement prédictif du risque de développer les symptômes à 5 ans (d'après le nombre de répétitions CAG).

3-4) Accident vasculaire cérébral ischémique

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la troisième cause de mortalité et la première cause d'invalidité dans le monde occidental. 85% des AVC sont ischémiques (AIC) donc liés à une occlusion d'une artère cérébrale. Le terme d'ischémie cérébrale caractérise un état durant lequel l'apport sanguin en oxygène et métabolites énergétiques, essentiellement le glucose, est en inadéquation par rapport aux besoins du tissu cérébral. Cet état entraîne, selon sa durée et son caractère irréversible ou non, de nombreuses atteintes du tissu cérébral, aux conséquences plus ou moins sévères.

Au plan physiopathologique, la lésion cérébrale présente un foyer de nécrose où l'importance de la perte neuronale est proportionnelle à la sévérité de l'ischémie. Cette zone est circonscrite par une zone de pénombre ou zone à risque, où l'intégrité structurelle des neurones est respectée, mais le fonctionnement altéré (333). Cette zone est la cible des traitements neuroprotecteurs, dont le potentiel est d'assurer une meilleure récupération fonctionnelle. En l'absence d'une reperfusion (spontanée ou par thrombolyse) immédiate, voire différée, la zone de pénombre est exposée aux dommages secondaires. Ceux-ci sont la conséquence de l'ouverture de la BHE, de la formation d'un oedème, de l'infiltration leucocytaire et de la libération de radicaux libres. La reperfusion tardive est elle-même destructrice car elle autorise un afflux massif de cellules immunitaires activées.

La cascade inflammatoire post-ischémique est dynamique puisqu'elle évolue avec le recrutement des cellules immunitaires, et régulée de manière spatio-temporelle par l'expression coordonnée des médiateurs de l'inflammation (cytokines, molécules d'adhésion) (334). Les thérapies anti-adhésive et neuroprotective ont fait l'objet de nombreuses études sur modèles animaux mais le transfert en clinique reste problématique (exemple des essais Enlimomab, utilisant un anticorps anti-ICAM-1(335), et ASTIN, ciblant la sous-unité CD11b de l'intégrine MAC-1 (336)) (337). Le rôle de l'activation gliale (astrocytes et microglie) est difficile à déterminer, mais elle pourrait contribuer à l'extension progressive de la lésion par la production de cytokines pro-inflammatoires (338).

Les modèles animaux ne reflètent pas l'hétérogénéité des situations physiopathologiques chez l'homme : typiquement, les modèles emploient un filament obturant l'artère cérébrale moyenne, et il n'y a donc pas de thrombus, susceptible d'évoluer au cours du temps. Ce constat est souvent fait pour expliquer les résultats décevants des essais cliniques de thérapies validées chez l'animal (339). L'imagerie non invasive peut fournir des marqueurs pour sélectionner les patients lors d'un essai.

Les développements de l'IRM ont permis l'amélioration de la prise en charge des AIC. L'IRM de diffusion (DWI) offre une vision très précoce de la zone infarctée. L'IRM de perfusion (PWI) montre une zone plus étendue, et la zone de pénombre peut être définie comme la différence PWI-DWI (340) (fig. 25). Le scanner et les techniques associées de perfusion et d'angiographie fournissent le même type d'informations (341). En TEP, la zone de pénombre est caractérisée par son état fonctionnel (flux sanguin cérébral et métabolisme de l'oxygène) (342), et l'intégrité neuronale peut être évaluée avec le [¹¹C]flumazenil, ligand des récepteurs GABAergiques (343).

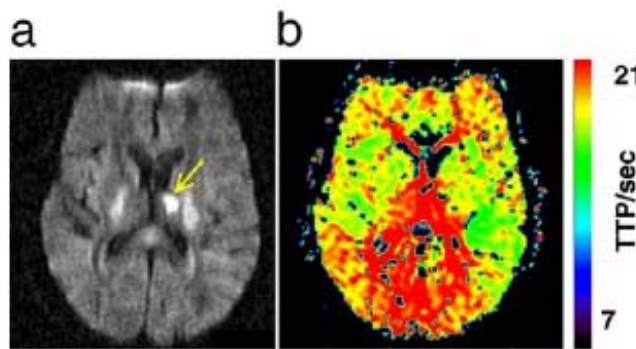


Figure 25. Comparaison des images de diffusion (a) et de perfusion (b) chez un patient. La diffusion montre un signal intense dans la lésion thalamique, alors que des déficits de perfusion plus étendus (image paramétrique « *time-to-peak* ») sont observés. (Extrait de Rudin *et al.*, 2003 (344).)

La caractérisation de l'inflammation a d'abord été réalisée par le marquage des leucocytes au technetium-99m (345) ou à l'indium-111 (346) pour l'imagerie TESP. Mais peu d'informations sur le plan physiopathologique ont été obtenues avec cette méthode. Récemment, le marquage indirect des macrophages par injection i.v. de fines particules d'oxyde de fer paramagnétiques (*Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxide*) a reçu beaucoup d'attention comme marqueur potentiel de l'inflammation au niveau cellulaire (347, 348). Le mécanisme du marquage (au niveau des ganglions lymphatiques ou de la lésion) et la formation du signal observé (augmentation du signal T1 parenchymal, diminution du signal T2 vasculaire) restent à confirmer, mais cet outil pourrait refléter la dynamique du recrutement inflammatoire dans la lésion primaire et la zone de pénombre.

L'imagerie TEP et le radioligand [¹¹C]PK11195 montrent, chez l'animal et chez l'homme, un marquage important des zones péri-infarctées associées à l'infiltration de cellules immunitaires (215, 349, 350). L'évolution temporelle du marquage est cohérente avec l'accumulation de macrophages (351). Plusieurs études ont montré un marquage persistant sur plusieurs mois des lésions secondaires associées à une activation microgliale sans infiltration cellulaire (352-354), conformément aux travaux expérimentaux antérieurs (145, 206). Ceci pourrait refléter l'atteinte synaptique des projections thalamocorticales ou corticothalamiques. Cependant, le lien avec l'apparition de séquelles tardives ou avec la récupération fonctionnelle n'a pas été examiné à ce jour.

3-5) Sclérose en plaques

La sclérose en plaques a longtemps été considérée comme la maladie neuroinflammatoire par excellence. Il s'agit d'une atteinte démyélinisante chronique de la matière blanche, avec une perte axonale importante, évoluant par phases dans sa forme clinique la plus courante (355). Elle est traditionnellement considérée comme une maladie auto-immune dont l'étiologie reste inconnue, avec des déterminants génétiques et

environnementaux suspectés. Le marqueur physiopathologique de la maladie est la plaque démyélinisante, caractérisée par une perte de myéline, des axones relativement préservés, et une cicatrice gliale. Dans la phase active de démyélinisation, un infiltrat lymphocytaire et monocytaire est présent dans les espaces périvasculaires (356). Le lymphocyte T auto-réactif est en général considéré comme l'acteur central au plan physiopathologique. D'après le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), induite chez l'animal par l'immunisation contre du tissu nerveux homologue, le développement des lésions procède en deux vagues d'invasion des cellules T dans le SNC : des lymphocytes pionniers traversent d'abord la BHE selon un mécanisme encore largement mystérieux. S'ensuit une période prodromique de quelques jours pendant laquelle l'endothélium cérébral et les cellules gliales deviennent réactives. En périphérie, les lymphocytes Th1 CD4+ prolifèrent et acquièrent un profil génétique qualifié de « migratoire ». L'invasion démyélinisante par des millions de cellules est alors possible, même si les signaux responsables du déclenchement et de la localisation de celle-ci restent inconnus. Les lésions et les symptômes résultants apparaîtraient essentiellement de manière indirecte, après la réactivation antigénique des cellules T au contact d'une cellule présentant l'antigène, via les cellules de la lignée monocytaire (microglie/macrophages) (357). Les contributions respectives à la perte neuronale, à la production de médiateurs inflammatoires et le rôle exact des monocytes/macrophages infiltrés et de la microglie activée sont discutés (358). Au point de vue expérimental, le marquage des lymphocytes avec un radioélément (carbone-14 (359)) ou un fluorophore (pour la microscopie à deux photons (360)) a largement contribué à l'état actuel des connaissances sur la dynamique et la composition cellulaire de l'attaque auto-immune.

La prise en charge clinique repose largement sur la modulation de l'inflammation par les corticostéroïdes et plus récemment l'interféron β , dont l'effet a été démontré sur l'apparition des plaques en IRM, mais dont le bénéfice net à long terme reste incertain (356), car des processus neuroinflammatoires sont également à l'oeuvre lors des phases de rémission avec remyélinisation partielle (361). L'activation endothéliale par l'expression des molécules d'adhésion et la rupture locale de la BHE constitue un événement crucial des phases de rechute (362), qui justifie l'intérêt d'une thérapie anti-adhésive (essais natalizumab, anticorps anti VLA-4 (363, 364)). Si la variété des séquences IRM conventionnelles (imagerie T2, séquence FLAIR (*fluid-attenuated inversion recovery*), imagerie T1 avec et sans gadolinium, analyse volumétrique) est un outil précieux pour établir le diagnostic et étudier l'évolution de la maladie, aucun paramètre issu de l'imagerie ne reflète fidèlement la sévérité de la maladie et le handicap conséquent (365). L'IRM reflète un ensemble de changements physiopathologiques plutôt qu'un changement histopathologique spécifique (366). Ceci résulte en une discordance entre neurodégénérescence et neuroinflammation, attribuée à des processus inflammatoires non détectés dans la matière blanche d'apparence normale en IRM, et à une quantification délicate des dommages axonaux (367, 368). Les liens de cause à effet unissant les processus auto-immuns, neuroinflammatoires et neurodégénérants sont actuellement rediscutés (fig. 26) (369, 370). La validation pour l'évaluation thérapeutique de techniques IRM plus récentes, comme le transfert de magnétisation, l'imagerie de diffusion, ou la spectroscopie de résonance magnétique est très attendue (371).

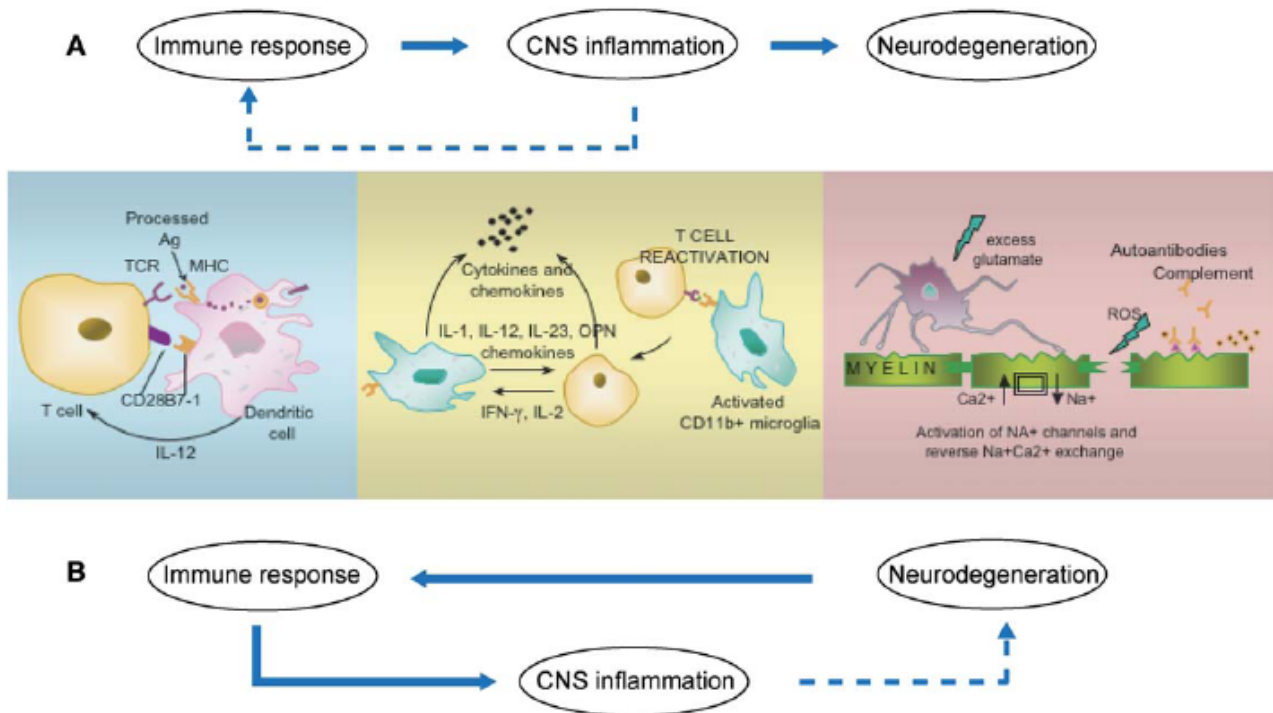


Figure 26. Modèles pathogéniques de la sclérose en plaques. (A) Conception traditionnelle des dégâts cérébraux comme conséquence de l'attaque auto-immune. (B) Hypothèse alternative proposant l'activation des cellules auto-immunes comme conséquence d'une toxicité asymptotique induite par une infection ou un autre facteur inconnu. (Extrait de Hauser et Oksenberg, 2006 (369))

Plusieurs études TEP ont suggéré que l'usage du radioligand [^{11}C]PK11195 pouvait bénéficier à la caractérisation des mécanismes pathologiques de la sclérose en plaques. Vowinckel *et al.* ont examinés 2 patients : l'un, en phase de rechute, présentait une lésion active en IRM avec un accroissement correspondant du signal en TEP, l'autre, en phase de rémission, présentait des lésions chroniques sans variation du signal TEP (151). Banati *et al.* ont fourni une étude très complète intégrant des données expérimentales et cliniques (152). Les auteurs ont logiquement confirmé une liaison importante dans les lésions récemment apparues et présentant une rupture de la BHE, et une liaison plus faible dans les lésions anciennes. Ils ont également mis en évidence un signal augmenté bien au-delà des zones de lésions définies par l'IRM, c'est-à-dire dans la matière blanche d'aspect normal, mais également dans le thalamus et dans les corps genouillés latéraux. Cet étude princeps interprète l'extension du signal [^{11}C]PK11195 comme le marqueur d'une activité pathologique pourtant « silencieuse » en IRM, et comme une projection neuroinflammatoire le long des fibres touchées. Dans une étude intégrant plus de patients (22 contre 12), et selon une approche semi-quantitative (372), Debruyne *et al.* ont montré que la liaison du [^{11}C]PK11195 était augmentée lors des phases de rechute dans les lésions visibles en IRM (T1 et T2), et la liaison dans la matière blanche d'apparence normale augmentait avec la durée de la maladie (373). Le même groupe a ensuite révélé une corrélation faible mais significative entre cette liaison dans la matière blanche et l'atrophie cérébrale globale (374). Ces travaux appuient l'hypothèse selon laquelle l'activité pathologique véritablement importante pour expliquer la progression de la maladie se situe dans la matière blanche d'apparence normale, expliquant ainsi la discordance apparente en IRM entre neurodégénérescence et neuroinflammation. L'imagerie TEP de la neuroinflammation apparaît de ce point de vue comme un outil complémentaire des techniques d'IRM conventionnelles. Cependant, la variation de la liaison

du [¹¹C]PK11195 au cours des phases de rechute et de rémission dans les différents types de liaison et dans la matière blanche reste insuffisamment caractérisée.

3-6) Autres neuropathologies

L'imagerie de la neuroinflammation a été explorée dans d'autres maladies neurologiques. Des cas d'encephalites (Rasmussen (375), herpes simplex (376)) sont caractérisés par une liaison très étendue et persistente du radioligand, éventuellement lié (comme cause ou conséquence) à l'atrophie cérébrale. L'encéphalite associée à l'infection par le virus du SIDA a fait l'objet de plusieurs travaux, chez le primate non humain (377) et chez l'homme (378, 379), puisqu'une contamination gliale plutôt que neuronale est largement acceptée (380). Contrairement à l'étude expérimentale, les études chez l'homme peinent à démontrer une différence significative de rétention du radioligand chez les patients atteints de troubles cognitifs, malgré une tendance à l'augmentation dans de multiples régions cérébrales.

La sclérose latérale amyotrophique semble également caractérisée par une activation gliale très diffuse touchant comme attendu le cortex moteur, mais également le pont, le thalamus et certaines régions corticales (381). Trois cas d'affection unilatérale du neurone moteur supérieur ont également été examinés, montrant des sites de fixation disparates, et conduisant les auteurs à remettre en cause la description purement clinique du syndrome de Mills (382). Des cas d'encéphalopathie hépatiques montrent également une liaison augmentée (383), en lien avec le statut altéré des cellules gliales par une synthèse dérégulée de neurostéroïdes. Une étude longitudinale est en cours chez des patients ayant subi un traumatisme crânien { #1443}, des données expérimentales montrant une évolution claire de la liaison du [3H]PK11195 (148, 158).

Le cas de la schizophrénie fait aussi l'objet d'un essai clinique actuellement ouvert au recrutement { #1444}, puisqu'une théorie postule une dysfonction microgliale périnatale (386), et un lien avec le comportement suicidaire a été suggéré (387). D'autres troubles cérébraux liés aux développements (palsie cérébrale, leukodystrophies (388), épilepsie (389), autisme (390, 391),) pourraient être liées à une inflammation périnatale et l'activation microgliale chez le nouveau-né après exposition *in utero* à une toxine a été récemment démontrée chez l'animal par l'utilisation du [¹¹C]PK11195 (392).

D'autres conditions pathophysiologiques sont susceptibles de présenter une réponse gliale importante, dont la détection *in vivo* n'a pas été explorée à ce jour : abcès cérébral (393, 394), douleurs chroniques (395, 396), maladies à prion (397)...

Ces études pilotes menées avec le [¹¹C]-(R)-PK11195 ont confirmé chez l'homme, de manière non invasive, que toutes les pathologies neuronales majeures étaient caractérisées par une réponse inflammatoire significative. Une activation microgliale, sans nécessaire infiltration périvasculaire de cellules immunitaires, est le support cellulaire de ces processus inflammatoires, en lien avec les niveaux élevés de médiateurs inflammatoires qui ont pu être détectés en immunohistochimie tissulaire.

4) Présentations des deux approches explorées

Cette partie présente et justifie les deux axes de développement retenus dans le cadre de ce travail de thèse. L'un concerne l'amélioration de la technique actuelle d'imagerie TEP utilisant le radiotracer $[^{11}\text{C}]\text{-PK11195}$, par l'évaluation de molécules alternatives se liant au même récepteur PBR. L'autre repose sur une approche combinatoire d'obtention de ligands envers une cible endothéliale d'intérêt pour le suivi des processus neuroinflammatoires, la protéine VCAM-1.

4-1) Limitations des études utilisant le $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$

Une vingtaine d'années après les premières études chez l'homme, la preuve du concept de l'imagerie de la réaction gliale ayant été documentée dans un large panel de neuropathologies, l'emploi du $[^{11}\text{C}]\text{-}(R)\text{-PK11195}$ reste pourtant confiné à quelques centres de recherche. Notamment, le groupe de l'hôpital Hammersmith de Londres a contribué à l'essentiel des données obtenues chez l'homme. Une raison évidente mais insuffisante pour expliquer ce constat est le marquage au carbone 11 qui requiert la production sur place du radioisotope. Les limitations de la technique tiennent essentiellement à 2 facteurs : la spécificité et la quantification (donc la sensibilité) du signal obtenu.

L'accroissement du signal par rapport aux conditions basales ou aux patients témoins est en règle générale associée à la présence de microglie activée et/ou de monocytes/macrophages infiltrés. Cependant, les études combinant microautoradiographie et immunohistochimie montrent un marquage basal important sans spécificité cellulaire évidente (152, 377).

De fait, peu de données existent sur les variations physiologiques constitutives des sites de liaison du PK11195 en relation avec la densité régionale de l'expression du PBR. En l'absence de toute pathologie, le cortex occipital humain possède trois fois plus de sites que le cervelet (202), et la matière grise est deux fois plus marquée que la matière blanche (152, 217). Ce niveau basal de fixation dans le cerveau sain n'a pas de source cellulaire identifiée. Chez le rongeur, les bulbes olfactifs et les cellules épendymales qui bordent les ventricules sont les zones de plus fort marquage, associée à une expression normale du PBR, non microgliale (398). Au niveau moléculaire, il est possible, comme cela a été mis en évidence pour Ro5-4864 (202), que la liaison du PK11195 au PBR soit modulée de manière allostérique par les protéines qui lui sont associées (partie A-2-1). En conséquence, la composante non spécifique de la liaison *in vivo* peut ne pas être uniforme.

Une certaine incertitude subsiste donc sur l'origine du signal lié au $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, qui dans certaines conditions ou certaines régions cérébrales, n'est peut-être pas corrélé à l'activation microgliale. Notamment, l'interprétation d'un signal distant d'un foyer pathologique certain est loin d'être immédiate et aisée : un signe précoce d'activité pathologique a été supposé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (297) comme

chez ceux atteints de sclérose en plaques (152). Une perte synaptique (dégénérescence rétrograde ou antérograde, activation trans-synaptique, « *synaptic stripping* ») est avancée pour expliquer l'extension du signal aux aires corticales des patients parkinsoniens (318) et des porteurs pré-symptomatiques du gène muté de la maladie d'Huntington (332). Au niveau thalamique, ces pertes pourraient également être liées à l'âge (152), ou à une lésion ischémique corticale avérée (353), ce dernier cas étant le seul qui soit étayé par des études expérimentales (145, 176). La présence de microglie activée comme source de signal spécifique dans des zones *a priori* non touchées par une pathologie donnée est très intéressante d'un point de vue diagnostique, mais reste largement supposée.

S'il est bien établi que la rétention du [¹¹C]-(R)-PK11195 est augmentée dans un large panel de neuropathologies (partie A-3), le signal est en général faible (BP<1) et difficile à quantifier de manière précise à cause du niveau de bruit inhérent aux images TEP. Le seuil d'activation gliale nécessaire à la mise en évidence d'un signal détectée sans ambiguïté en TEP est une considération importante. Schuitemaker *et al.* n'ont pas détecté d'accroissement du signal chez des patients souffrant de troubles cognitifs légers (*Mild Cognitive Impairment*), alors qu'un certain nombre de ces patients évolue vers le développement d'une maladie d'Alzheimer (399). De même, la démence éventuellement associée à l'infection par le virus du SIDA n'a pas été détectée *in vivo* (379), alors que l'activation microgliale concomitante est une donnée expérimentalement établie (154).

D'un point de vue quantitatif, la spécificité de la liaison cérébrale du [¹¹C]PK11195 *in vivo* n'a pas pu être démontrée par des méthodes conventionnelles de pré-traitement/déplacement (400) ou par l'emploi d'une haute et basse radioactivité spécifique (401). Le blocage bien plus important de sites spécifiques en périphérie qu'au niveau du SNC conduit à une concentration plasmatique augmentée, et finalement, à un accroissement de la liaison dans le cerveau. Moyennant une normalisation des courbes au pic de distribution, la liaison spécifique est estimée à 40% de la liaison totale dans un cerveau sain de babouin (400). *Ex vivo*, dans un modèle neuroinflammatoire chez le rat, la liaison spécifique a ensuite été estimée à 30% de la liaison totale (219).

Ceci, en dépit d'une caractérisation pharmacologique étendue, a longtemps gêné la modélisation du comportement cinétique du radiotracer. D'autres problèmes (formation d'un produit secondaire lors de la radiosynthèse en conditions basiques (402), liaison à une protéine plasmatique (403)) ont contribué à la difficulté d'établir un modèle compartimental fiable pour quantifier correctement des études d'imagerie. En l'absence de fonction d'entrée plasmatique, des méthodes avec région de référence ont été employées, notamment le modèle simplifié avec tissu de référence (SRTM). La définition d'une région de référence dénué de sites de liaison spécifique pose évidemment problème dans le cas de pathologies étendues ou de localisation incertaine. D'où l'introduction de méthodes d'analyse par voxel (segmentation en « *clusters* »), pour extraire d'une image une région dont chacun des points partage une cinétique similaire, de clairance rapide. Typiquement, cette méthode identifie un cluster extracérébral, et un cluster cérébral majoritaire associé à la matière grise corticale (152). Ce dernier tient lieu de référence pour générer une image pondérée des valeurs de potentiel de liaison régionales. L'introduction non contrôlée d'un niveau de bruit important générée par l'analyse du signal par voxel et le faible degré de confiance accordé à la région de référence résultante sont les principales critiques habituellement adressées à cette méthode (220), largement utilisée par le groupe de Londres pour l'analyse des données [¹¹C]-(R)-PK11195 (404). Le groupe d'Amsterdam a réalisé ces deux dernières années des avancées importantes

en terme de modélisation du signal [¹¹C]-(R)-PK11195 : en premier lieu la validation d'un modèle compartimental avec fonction d'entrée plasmatique (405), deuxièmement la comparaison de différentes variantes du STRM pour une analyse sans fonction d'entrée (406), et troisièmement l'évaluation d'une région de référence pour le cas de la maladie d'Alzheimer (407). Parallèlement, des méthodes d'analyses paramétriques sont explorées par les deux groupes (408-411).

Les prochaines années verront donc certainement apparaître le résultat d'études cliniques plus ambitieuses et plus rigoureusement quantifiées que les études pilotes déjà menées, ce avec des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Amsterdam) et d'Huntington (Hammersmith).

Il reste que la faible biodisponibilité du ligand envers le tissu cérébral, et le niveau élevé de fixation non spécifique donnent du poids à la variation inter-individuelle et nuisent à la sensibilité de détection globale de la méthode : il sera difficile avec le [¹¹C]-(R)-PK11195 de mettre en évidence des variations fines donc très précoces de la liaison liée à une activation microgliale. Ces considérations, ainsi que le potentiel thérapeutique des ligands du PBR (partie A-2-1) ont motivé la recherche très active ces 5 dernières années de molécules alternatives au PK11195, permettant de cibler le marqueur neuroinflammatoire bien établi que constitue le PBR, avec l'espoir de disposer de propriétés pharmacocinétiques plus favorables.

4-2) Imagerie TEP de la neuroinflammation grâce aux radioligands du PBR

Face à l'accroissement exponentiel de publications présentant le radiomarquage de ligands du PBR, il est primordial de pouvoir rapidement identifier les candidats les plus sérieux à des essais cliniques. Cette revue rappelle les structures chimiques explorées, liste les molécules radiomarquées, et donne une lecture critique des résultats obtenus en imagerie préclinique jusqu'à présent, suggérant un emploi plus systématique des modèles animaux de la neuroinflammation afin d'évaluer correctement le potentiel de ces composés.

Chauveau, F.; Boutin, H.; Tavitian, B., Neuroinflammation PET imaging with PBR radioligands: a review. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (**En préparation**).

Texte intégral :

Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dollé F, Tavitian B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2008**;35(12):2304-2319. doi:[10.1007/s00259-008-0908-9](https://doi.org/10.1007/s00259-008-0908-9)

Grâce à des collaborations académiques et industrielle, nous avons réalisé l'évaluation comparative au [¹¹C]-(R)-PK11195 de 5 radiotraceurs potentiels du PBR. Nous avons pour cela utilisé 2 modèles de la neuroinflammation chez le rongeur (rat et souris), et une caméra dédiée à l'imagerie du petit animal, afin de tester ces candidats dans des conditions proches de leur utilisation clinique potentielle.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans le **chapitre C**.

4-3) Autres cibles d'intérêt pour l'imagerie de la neuroinflammation

La cible PBR bénéficie aujourd'hui de l'expérience acquise depuis 20 ans, et l'imagerie de la neuroinflammation avec le [¹¹C]-(R)-PK11195 fait figure de preuve de concept. Mais comme évoqué dans la partie précédente, quantité d'autres cibles d'intérêt pour l'imagerie sont apparues, qu'elles soit microgliales ou situées sur un autre type cellulaire.

Choix d'une cible endothéliale

La thérapie anti-adhésive suscite beaucoup d'intérêt depuis la découverte de ses bases moléculaires (sélectines, intégrines et molécules d'adhésion), mais malgré de nombreux résultats pré-cliniques prometteurs, on dénombre peu de succès lors des essais cliniques. Plusieurs raisons sont évoquées (13, 412, 413) : le haut poids moléculaire des agents testés (exemple du saccharide CY1503 mimant le sialyl Lewis X), l'inadéquation des modèles animaux (exemple, dans le cas des essais anti-CD18, des modèles d'ischémie qui sur-estiment les dégâts liés à la reperfusion), ainsi que la multiplicité des partenaires de chaque récepteur moléculaire.

Le statut de l'endothélium vasculaire est également susceptible d'être affecté par le vieillissement, et l'on considère que ces changements liés à l'âge favorisent un état pro-inflammatoire (414, 415). Ceci représente un paramètre important pour l'évaluation des thérapies et pour la compréhension d'une vulnérabilité accrue à certaines pathologies avec l'âge.

La TEP, comme imagerie moléculaire quantitative, offre la possibilité de valider le mécanisme d'action d'un agent thérapeutique, ou la pertinence d'une cible, et de sonder l'état de l'endothélium en conditions normales et pathologiques. Nous avons choisi d'aborder le développement d'une imagerie « endothéliale » comme alternative à l'imagerie « gliale » fournie par le [¹¹C]PK11195.

Sélectine ou molécule d'adhésion cellulaire ?

Les sélectines et les molécules d'adhésion cellulaire sont les deux groupes principaux de récepteurs endothéliaux sur-exprimés en conditions inflammatoires (cf partie A-1-2), respectivement associés aux étapes de roulement et d'adhésion ferme des leucocytes. Les molécules d'adhésion cellulaire sont exprimées dans de nombreux tissus du corps, et leur participation aux conditions inflammatoires chroniques est systématique (14, 416). Les facteurs solubles sVCAM-1 et sICAM-1 sont déjà utilisés comme marqueurs sanguin du

risque ischémique coronarien (417, 418), ou cérébral (419), mais ils ne sont pas spécifiques de ces conditions physiopathologiques (47).

Dans le cas de neuropathologies comme la sclérose en plaques, leur détection dans le sang ou le LCR fournit des résultats contradictoires (420, 421), ceci car les causes et mécanismes de production de ces facteurs solubles à partir des formes membranaires sont mal compris (362), et parce que leur origine cellulaire n'est pas limitée à l'endothélium et inclut une contribution périvasculaire et gliale (422, 423).

Il existe donc une attente véritable envers la possibilité de réaliser l'imagerie des molécules d'adhésion cellulaires au niveau du SNC. Par ailleurs, même si cela n'est pas clairement établi, certaines sélectines pourrait faciliter le passage de la BHE par des leucocytes en l'absence de stimulus inflammatoire (cf partie A-1-3), ce qui suggère un niveau basal d'expression non nul, plutôt défavorable à l'obtention d'un bon rapport signal sur bruit. Nous avons donc décidé de cibler une molécule d'adhésion cellulaire plutôt qu'une sélectine.

ICAM-1 ou VCAM-1 ?

Parmi les molécules d'adhésion cellulaire de la super-famille des immunoglobulines (fig. 27), ICAM-1 et VCAM-1 joue un rôle prééminent pour le recrutement des cellules immunitaires dans les zones inflammatoires.

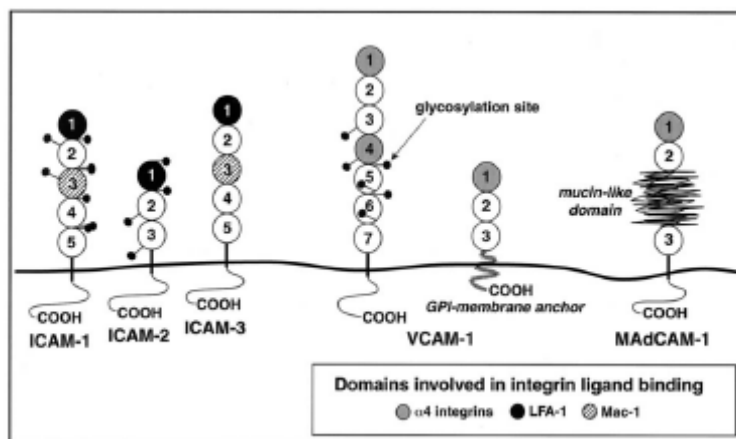


Figure 27. Structure générale des molécules d'adhésion cellulaire de la super-famille des immunoglobulines, soulignant la structure en domaines, les domaines impliqués dans la liaison aux ligands endogènes, les sites de glycosylation potentiels. VCAM-1 apparaît sous sa forme complète (7 domaines (424)) et tronquée (3 domaines (425)). Extrait de Carter et al., 2001 (9)

Les fragments N-terminaux à 2 domaines de ICAM-1 et VCAM-1, impliqués dans la liaison aux intégrines ligands, ont été cristallisés. Le fait de pouvoir obtenir en quantité la protéine ou un fragment sous forme purifiée est un élément capital pour la recherche d'un nouveau ligand.

La structure aux rayons X des domaines 1 et 2 de VCAM-1 humaine (VCAM-1,2d) a pu être déterminée grâce à un système d'expression bactérien utilisant un peptide signal (ompA) qui dirige la sécrétion de la protéine recombinante dans l'espace périplasmique bactérien, pour éviter la formation d'aggrégats insolubles (426). Ces deux domaines ne contiennent pas de sites de N-glycosylation, et correspondent à un fragment recombinant de 22,5kDa.

La structure du fragment similaire de ICAM-1 (ICAM-1,2d) a été obtenue à partir d'une expression dans des cellules CHO et purifiée par chromatographie d'immuno-affinité (427). Quatre sites potentiels de N-glycosylation sont présents sur ce fragment.

La conformation globulaire (fig. x) de chacun des domaines, formé de 2 feuillets β anti-parallèles incluant un pont di-sulfure, et le court lien inter-domaine offre une structure assez rigide, très compacte (427-430). Les structures N-terminales de ces 2 protéines sont très

proches – nomenclature (22) de type « intermédiaire » (I) pour le domaine 1 et de type « constant » (C2) pour le domaine 2 – en dépit d’une faible homologie (30%).

L’interaction avec le ligand intégrine apparaît très conservée au sein de cette famille de protéines. Le motif critique QID(40)S du domaine 1 de VCAM-1 (en jaune sur la figure 28, à droite) peut, sans perturbation de l’activité, être remplacé par le motif G(37)IET de ICAM-1 (G(37) en noir sur la figure 28, à gauche) (431) montrant la généralité du motif « a.a. aliphatique – aspartate ou glutamate – sérine ou thréonine – proline or a.a. hydrophile » dans la reconnaissance des intégrines (432).

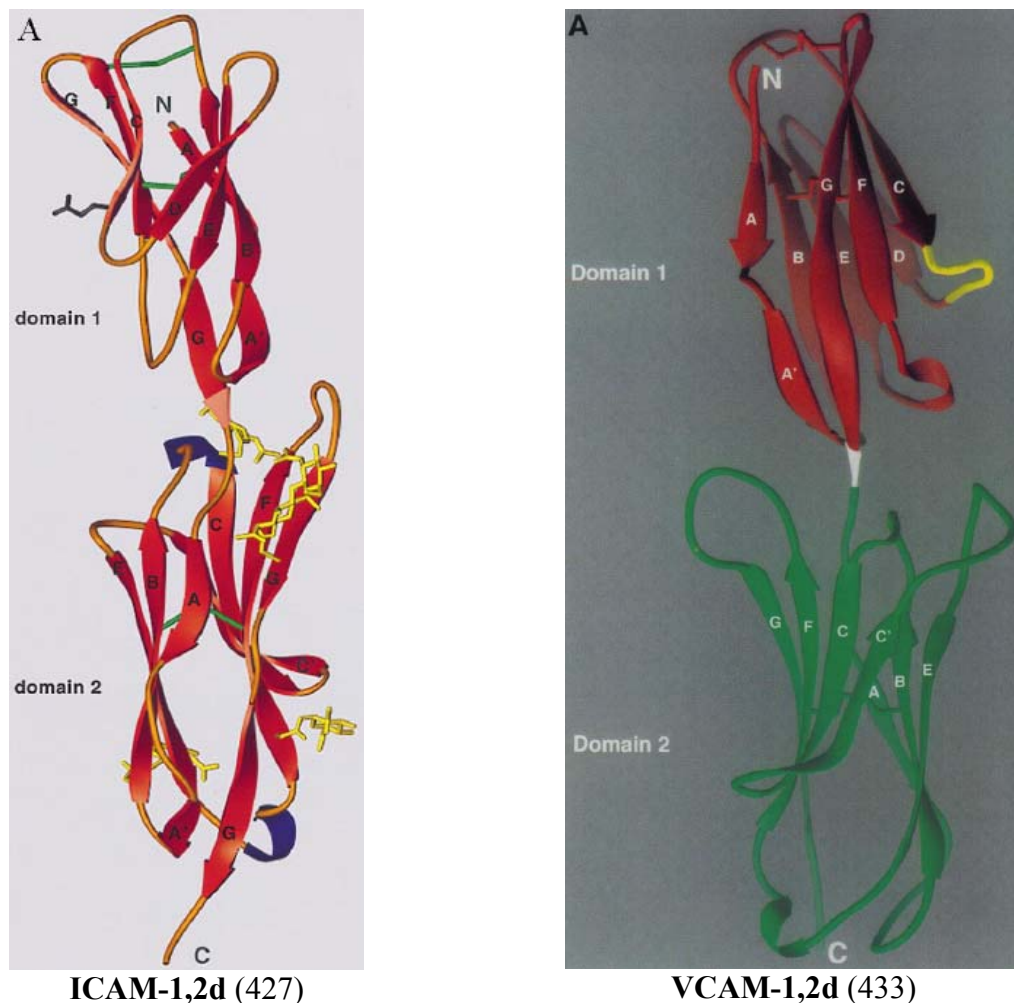


Figure 28. Diagrammes en ruban des structures aux rayons X des fragments N-terminaux de ICAM-1 (à gauche : les motifs de N-glycosylation sont en jaune, l’acide aminé critique G(37) est en noir) et VCAM-1 (à droite : la boucle critique QID(40)S est en jaune).

Les raisons ci-dessous nous ont conduit à choisir VCAM-1 plutôt que ICAM-1 comme cible pour le développement d’un ligand destiné à l’imagerie :

- *In vivo*, l’expression basale peut être quantifiée par injection d’anticorps radiomarqués : celle de VCAM-1 est en général plus faible que celle de ICAM-1, notamment dans le cas du cerveau (434, 435).
- La séquence de VCAM-1 a été plus conservée que celle de ICAM-1 au plan de l’évolution. Au niveau protéique, l’homologie entre la forme humaine et celles de rat et de souris atteint respectivement 77% et 76% (13, 424).

- VLA-4, l'intégrine contre-récepteur de VCAM-1, est absent de la surface des neutrophiles (12, 13), donc l'imagerie de VCAM-1 par rapport à celle de ICAM-1 pourrait recèler une spécificité supplémentaire, caractéristique du recrutement des monocytes et dans une moindre mesure des lymphocytes, plutôt que de l'ensemble des leucocytes (436, 437). Ceci est cohérent avec les résultats des études de blocage ou d'inactivation des intégrines β_2 (évoquées dans la partie A-1-2) et le rôle prédominant qui est attribué à VCAM-1 dans plusieurs situations inflammatoires chroniques (sclérose en plaques (438), athérosclérose (439)).
- Selon des arguments biologiques et structuraux (440), ICAM-1 est exprimée sous forme dimérique (par l'intermédiaire des domaines 1 (427) et 4 (440)). Cependant, chaque monomère est pleinement fonctionnel quant à la liaison à LFA-1 (441). Cette dimérisation est difficilement reproductible avec un fragment purifié, et peut influencer la liaison d'un ligand.
- La glycosylation des 2 domaines N-terminaux de ICAM-1 pourrait influencer sur la conformation de la protéine (442). Ceux de VCAM-1 ne sont pas glycosylés, ce qui rend moins risqué la production de la cible par un système bactérien (chapitre B).

4-4) Sélection d'aptamères pour l'imagerie de l'inflammation

Nous présentons ici la notion de ligand-aptamère, la méthode combinatoire à la base de leur obtention, et l'état de l'art concernant ceux dirigés contre des cibles pertinentes pour l'inflammation. Les avantages de cette approche par rapport aux travaux existants sur l'imagerie des molécules d'adhésion cellulaires sont mis en avant à la fin de cette partie.

4-4-1) Présentation des aptamères et de leurs applications

Cette revue détaille la théorie et la pratique de la sélection d'aptamères, avant de balayer le large éventail des applications avérées ou supposées de ces ligands.

Chauveau, F.; Pestourie, C.; Tavitian, B., Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. [Aptamers: selection and scope of applications.]. *Pathol Biol (Paris)* **2006**;54(4):251-8.

Texte intégral :

Chauveau F, Pestourie C, Tavitian B. [Aptamers: selection and scope of applications]. *Pathol Biol (Paris)*. **2006**;54(4):251-258.
doi:[10.1016/j.patbio.2006.03.002](https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.03.002)

4-4-2) Aptamères et inflammation

Plusieurs aptamères ont déjà été sélectionnés contre des cibles liées à l'inflammation (443, 444), notamment avec l'idée d'exploiter un effet inhibiteur, donc anti-inflammatoire sur celle-ci. Une thérapie anti-adhésive (445) a ainsi été envisagée avec l'emploi d'aptamères anti-sélectine P (446) et L (447), ou anti-sialyl Lewis X (448), dont l'activité inhibitrice a été mise en évidence *in vitro*. Dans le cas de la sélectine L, la sélection avait été menée à température ambiante et le passage à 37°C modifiant la conformation de l'oligonucléotide, l'affinité de l'aptamère était altérée *in vivo*. Des sélection menée à 37°C contre une protéine de fusion recombinante L-selectine/IgG a fourni des aptamères 2'-fluoro-ARN et ADN inhibant la circulation leucocytaire vers les ganglions lymphatiques de la souris SCID (449).

La phospholipase A2 (450), qui est une protéine sécrétée, la protéine C5 du complément, coupée en C5a et C5b lors de l'activation du système (451), la cytokine oncostatin M (452), l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (453) et les chimiokines CXCL10 (454) et CCL1 (455) ont également été ciblées et leur activité a été inhibée par un aptamère sur tests cellulaires. La mise au point d'un agent anti-coagulant dénué des risques associés à l'héparine a fait l'objet de développements plus importants, avec la sélection d'aptamères se liant à la thrombine (456) et au facteur IXa (457), qui devraient bientôt être évalués cliniquement.

Dans le domaine de l'auto-immunité, citons la sélection d'aptamères contre les anticorps des récepteurs à l'insuline (458) et à l'acétylcholine (459), et contre l'immunoglobuline E (460). Concernant l'immunomodulation, un aptamère reconnaissant l'interféron γ a inhibé sa liaison au récepteur sur culture cellulaire (461), et CTLA-4 a été ciblé avec succès, et agit *in vivo* comme adjuvant en immunothérapie du mélanome (462). Une sélection contre un auto-anticorps anti-ADN caractéristique du lupus érythémateux a également été décrite (463). Enfin, des aptamères se liant *in vitro* à des cibles neuropathologiques comme le peptide amyloïde synthétique (1-40) (464), les isoformes PrP^C (465) et PrP^{Sc} (465) de la protéine prion ont été décrits, et l'entreprise NOXXON Pharma AG a produit deux *spiegelmers* (aptamères en série L non naturelle, résistant à la dégradation par les nucléases) reconnaissant des neuropeptides (466, 467).

Les cibles intracellulaires utilisées pour la sélection d'aptamères sont souvent des protéines interagissant naturellement avec les acides nucléiques. Ainsi, le facteur de transcription central NF- κ B se lie à l'ADN cellulaire lors de sa translocation. Des aptamères ADN (468) et ARN (469) mimant la structure naturellement reconnue par le facteur ont été identifiés. L'aptamère ADN, agissant comme leurre, a démontré un effet sur plusieurs modèles animaux, y compris un modèle d'ischémie cérébrale globale où la production de cytokines (TNF- α , IL-1) et de molécules d'adhésion (ICAM-1), ainsi que la perte neuronale ont été atténuées (470). Un tel effet thérapeutique requiert une transfection, difficilement transposable chez l'homme en l'état.

Une approche originale d'obtention de molécule active consiste à lier de manière covalente un inhibiteur déjà connu à une banque d'oligonucléotides afin de sélectionner la « molécule-hybride » résultante la plus active. La preuve de ce concept a été faite avec l'élastase neutrophile, une protéase à sérine sécrétée, contre laquelle un aptamère lié un inhibiteur dérivé de la valine a permis d'augmenter de 2 ordres de grandeur la vitesse d'inactivation de l'enzyme (471). Cet aptamère inhibe partiellement l'infiltration des neutrophiles dans un modèle d'inflammation pulmonaire (472). Cependant, les doses

nécessaires sont importantes et le protocole invasif (40 nmol distillées dans la trachée en même temps que l'allergène).

4-4-3) Imagerie TEP des aptamères : avantages potentiels pour l'imagerie de VCAM-1

L'aptamère anti-élastase a été le premier aptamère visualisé de manière non-invasive, après marquage au Tc-99. Un meilleur rapport signal sur bruit est obtenu, et ce plus tôt, qu'avec l'anticorps utilisé cliniquement, dans un modèle d'inflammation locale (réaction d'Arthus) (473). Depuis, plusieurs méthodes de radiomarquage des oligonucléotides simple-brins ont été décrites (474, 475). Celle développée au Service Hospitalier Frédéric Joliot (476) repose sur le marquage d'un synthon au fluor 18, suivi du couplage régiosélectif avec l'oligonucléotide modifié en 5' sous forme de phosphorothioate (fig. 29).

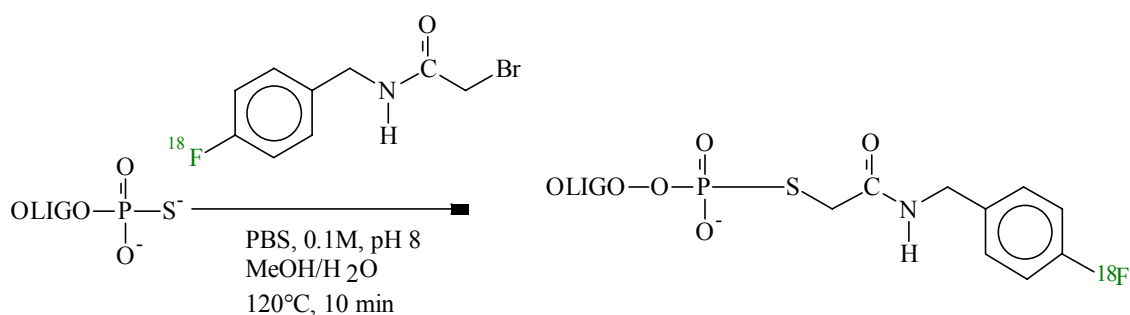


Figure 29. Méthode générale de marquage des oligonucléotides. Le synthon bifonctionnel N-(4-fluorobenzyl)-2-bromoacétamide où l'halogène du benzyl est un isotope radioactif du fluor (^{18}F , émetteur β^+) est couplé par conjugaison régiosélective avec le thiol d'un oligonucléotide dont l'extrémité 3' a été modifiée en 3' phosphorothioate.

Les propriétés de biodistribution des aptamères (477, 478), et les modifications permettant d'allonger leur temps de circulation (couplage au PEG (479), au cholestérol (480), formation de liposomes (481)), et de réduire leur dégradation (modifications classiques du sucre en 2'), ont déjà fait l'objet de nombreux travaux, en particulier de la part des sociétés NeXstar Pharmaceuticals et Archemix Corporation. La preuve du concept de l'imagerie d'un radioligand-aptamère a été confirmé récemment en cancérologie (482, 483).

Le développement d'agents de contraste pour l'IRM ou l'imagerie ultrasonore de la surface endothéliale a été évoqué dans la partie A-2-3. Notamment, un groupe a récemment couplé un anticorps (484) ou un peptide homologue à la séquence de VLA-4 (485) à une nanoparticule paramagnétique et fluorescente. La bimodalité permet de valider la modification du signal IRM. L'obtention par la technique du *phage display* réalisée directement chez la souris d'un peptide suscitant l'internalisation de la nanoparticule a permis d'améliorer le rapport signal sur bruit en IRM et de réaliser le suivi du traitement par l'atorvastatine de la plaque athéromateuse chez des souris apoE^{-/-} soumis un régime cholestérolémique (259).

La haute résolution de l'IRM est particulièrement adaptée au cas de l'athérosclérose, mais le contraste négatif fourni (diminution de T₂), et la longue période d'accumulation (48h) nécessaire à l'obtention de celui-ci seraient de sérieux inconvénients dans le cas de

l'ischémie, par exemple. La démonstration d'une sensibilité suffisante, et de l'absence d'immunogénicité pour une application chez l'homme reste à apporter. A ce sujet, l'approche de sélection d'un aptamère (non immunogénique) pour l'imagerie TEP (de sensibilité supérieure) offre *a priori* de meilleures garanties.

Les autres techniques basées sur l'emploi des oligonucléotides incluent l'interférence ARN et les oligonucléotides antisens (486). Celles-ci visent d'abord à obtenir un effet inhibiteur, et sont défavorables à l'obtention d'un contraste en imagerie par la faible concentration de la cible (ARNm), et la localisation intracellulaire de celle-ci.

In vivo, des oligonucléotides antisens de ICAM-1 et VCAM-1 injectés sans transfectant diminue l'expression de ces protéines mais cet effet requiert des doses thérapeutiques (et circulantes) incompatibles avec l'imagerie d'un radiotracer (487). Néanmoins, moyennant une chimie résistante à la dégradation (acide nucléique peptidique) et le ciblage d'un transporteur efficace (récepteur de la transférine), le groupe de Pardridge a montré dans un protocole *ex vivo* (marquage à l'indium) que l'imagerie de l'expression d'un gène dans le cerveau était possible selon une stratégie antisens (488-490).

La stratégie aptamère est plus directe, et représente le seul cas de l'emploi d'un oligonucléotide pour le ciblage d'une cible extracellulaire (plus abondante) et, en ce qui concerne VCAM-1, intravasculaire (plus accessible).

Le **chapitre B** décrit donc la sélection d'un aptamère anti-VCAM-1, destiné à une utilisation en imagerie TEP.

Bibliographie du chapitre A

1. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:93-131.
2. Genetet N, (Coordonnateur). *Immunologie*. Editions Médicales Internationales ed: Lavoisier; 2002.
3. Bohuon C. [Inflammatory cascade response to toxin release: therapeutic perspectives]. *Ann Pharm Fr* 2001;59:191-7.
4. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340(6):448-54.
5. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332(20):1351-62.
6. Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today* 1997;18(10):483-6.
7. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 2000;29(4):293-304.
8. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004;18(3):385-405.
9. Carter RA, Wicks IP. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum* 2001;44(5):985-94.
10. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
11. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67(6):1033-6.
12. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-34.
13. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84(7):2068-101.
14. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361-78.
15. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 1994;8(8):504-12.
16. Elangbam CS, Qualls CW, Jr., Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol* 1997;34(1):61-73.
17. Spertini O, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Tedder TF. Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature* 1991;349(6311):691-4.
18. Wolitzky B, Kwee L, Terry R, Kontgen F, Stewart C, et al. Targeted disruption of the murine E-selectin and VCAM-1 genes. *Journal of Cellular Biochemistry* 1994;56(S18A):256-303.
19. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 1993;74(3):541-54.
20. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 1996;335(1):43-5.
21. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 1995;181(6):2259-64.
22. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381-405.
23. Edelman GM. CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev* 1987;100:11-45.
24. Slich JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, et al. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8529-33.
25. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 1995;121(2):489-503.

26. Srinivasan S, Baldwin HS, Aristizabal O, Kwee L, Labow M, et al. Noninvasive, in utero imaging of mouse embryonic heart development with 40-MHz echocardiography. *Circulation* 1998;98(9):912-8.
27. Koni PA, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* 2001;193(6):741-54.
28. Leuker CE, Labow M, Muller W, Wagner N. Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med* 2001;193(6):755-68.
29. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(2):138-52.
30. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 1991;147(9):2913-21.
31. Greenwood J, Amos CL, Walters CE, Couraud PO, Lyck R, et al. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol* 2003;171(4):2099-108.
32. Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol* 2002;39(9):499-508.
33. Kelly KA, Allport JR, Yu AM, Sinh S, Sage EH, et al. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *J Leukoc Biol* 2007;81(3):748-56.
34. Makarem R, Newham P, Askari JA, Green LJ, Clements J, et al. Competitive binding of vascular cell adhesion molecule-1 and the HepII/IIIICS domain of fibronectin to the integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* 1994;269(6):4005-11.
35. Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 1998;56(6):977-88.
36. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268(5208):233-9.
37. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):432-44.
38. Henderson RB, Hobbs JA, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 2003;102(1):328-35.
39. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80(3):413-22.
40. Henderson RB, Lim LH, Tessier PA, Gavins FN, Mathies M, et al. The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med* 2001;194(2):219-26.
41. Gironella M, Molla M, Salas A, Soriano A, Sans M, et al. The role of P-selectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. *J Leukoc Biol* 2002;72(1):56-64.
42. Bianchi E, Bender JR, Blasi F, Pardi R. Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol Today* 1997;18(12):586-91.
43. Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, et al. X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *Embo J* 2001;20(16):4391-8.
44. Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA. The last molecular fortress in leukocyte transendothelial migration. *Nat Immunol* 2002;3(2):116-8.
45. Newham P, Craig SE, Seddon GN, Schofield NR, Rees A, et al. Alpha4 integrin binding interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. Integrin binding footprints identify accessory binding sites that play a role in integrin specificity. *J Biol Chem* 1997;272(31):19429-40.
46. Bhasin N, Carl P, Harper S, Feng G, Lu H, et al. Chemistry on a single protein, VCAM-1, during forced unfolding. *J Biol Chem* 2004.
47. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170(2):191-203.

48. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 1995;376(6540):517-9.
49. Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
50. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 1996;334(23):1526-9.
51. Hill PA, Main IW, Atkins RC. ICAM-1 and VCAM-1 in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995;47(5):1383-91.
52. Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol* 1997;158(10):5050-7.
53. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res* 2003;60(1):49-57.
54. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-66.
55. Lewis MJ, D'Cruz D. Adhesion molecules, mycophenolate mofetil and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005;14 Suppl 1:s17-26.
56. Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005;37(11):811-8.
57. Komatsu S, Panes J, Russell JM, Anderson DC, Muzykantov VR, et al. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29(2):683-9.
58. Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunol Today* 1998;19(4):169-72.
59. Radi ZA, Kehrl ME, Jr., Ackermann MR. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *J Vet Intern Med* 2001;15(6):516-29.
60. Simpson E. A historical perspective on immunological privilege. *Immunol Rev* 2006;213:12-22.
61. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999;57(6):563-81.
62. Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 2006;26(2):149-88.
63. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003;3(7):569-81.
64. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, et al. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro* 2005;19(3):299-334.
65. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol* 2002;68(5):311-23.
66. Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001;36(2):118-24.
67. Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA, Jr. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 2000;123 (Pt 6):1092-101.
68. Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 2003;17(1):13-9.
69. Rebenko-Moll NM, Liu L, Cardona A, Ransohoff RM. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol* 2006;18(6):683-9.
70. Quan N, Herkenham M. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. *Histol Histopathol* 2002;17(1):273-88.
71. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 2002;3(3):216-27.
72. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;21(2):195-218.

73. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2002;202(1-2):13-23.
74. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3(6):537-44.
75. Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoit JP. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* 2003;24(19):3311-31.
76. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 2006;354(6):553-5.
77. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 2004;75(3):388-97.
78. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;20(3):269-87.
79. Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J Neuroimmunol* 2004;151(1-2):116-25.
80. Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1992;148(7):1985-92.
81. Raivich G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 2005;28(11):571-3.
82. Farber K, Kettenmann H. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):133-43.
83. Newman TA, Galea I, van Rooijen N, Perry VH. Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury. *J Neuroimmunol* 2005;166(1-2):167-72.
84. Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 2005;11(3):252-3.
85. Drojdahl N, Fenger C, Nielsen HH, Owens T, Finsen B. Dynamics of oligodendrocyte responses to anterograde axonal (Wallerian) and terminal degeneration in normal and TNF-transgenic mice. *J Neurosci Res* 2004;75(2):203-17.
86. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30(1):77-105.
87. Liu W, Brosnan CF, Dickson DW, Lee SC. Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am J Pathol* 1994;145(1):48-53.
88. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005;308(5726):1314-8.
89. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8(6):752-8.
90. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007;446(7139):1091-5.
91. Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 2005;309(5733):392-3.
92. Narasimhan K. Brain's guard cells show their agility. *Nat Neurosci* 2005;8(6):707.
93. Kettenmann H. Neuroscience: the brain's garbage men. *Nature* 2007;446(7139):987-9.
94. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19(8):312-8.
95. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):196-206.
96. Town T, Nikolic V, Tan J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2005;2:24.
97. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992;48(2):405-15.
98. Rezaie P. Mesoglia and Microglia. http://www.wibronline.com/Pub_Main_Display.asp?Main_ID=12 2003.

99. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993;7(1):111-8.
100. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005;81(3):302-13.
101. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4(1):65-84.
102. Dobrenis K. Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease. *Methods* 1998;16(3):320-44.
103. Ponomarev ED, Novikova M, Maresz K, Shriver LP, Dittel BN. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J Immunol Methods* 2005;300(1-2):32-46.
104. Lyons SA, Pastor A, Ohlemeyer C, Kann O, Wiegand F, et al. Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(11):1537-49.
105. Menet V, Prieto M, Privat A, Gimenez y Ribotta M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(15):8999-9004.
106. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302(5651):1760-5.
107. Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13632-7.
108. Liedtke W, Edelmann W, Chiu FC, Kucherlapati R, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. *Am J Pathol* 1998;152(1):251-9.
109. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999;23(2):297-308.
110. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 2006;129(Pt 10):2761-72.
111. Carmen J, Gowing G, Julien JP, Kerr D. Altered immune response to CNS viral infection in mice with a conditional knock-down of macrophage-lineage cells. *Glia* 2006;54(2):71-80.
112. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 2007;27(10):2596-605.
113. Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005;11(2):146-52.
114. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(10):734-44.
115. Blais V, Rivest S. [Role of the innate immune response in the brain]. *Med Sci (Paris)* 2003;19(10):981-7.
116. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(3-4):259-75.
117. Kushner I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(3-4):191-6.
118. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* 2004;3(4):169-76.
119. Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 2006;29(9):506-10.
120. Streit WJ. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):234-9.
121. Croisier E, Graeber MB. Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 2006;112(5):517-30.
122. Polazzi E, Contestabile A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 2002;13(3):221-42.

123. Wekerle H. Planting and pruning in the brain: MHC antigens involved in synaptic plasticity? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(1):3-4.
124. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev* 2007;55(1):89-96.
125. Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolò C, Caniglia S, et al. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 2006;138(3):869-78.
126. Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999;100(1-2):111-4.
127. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006;9(2):268-75.
128. Meeuwssen S, Bsibsi M, Persoon-Deen C, Ravid R, van Noort JM. Cultured human adult microglia from different donors display stable cytokine, chemokine and growth factor gene profiles but respond differently to a pro-inflammatory stimulus. *Neuroimmunomodulation* 2005;12(4):235-45.
129. Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 2000;20(16):6309-16.
130. Guo L, Sawkar A, Zasadzki M, Watterson DM, Van Eldik LJ. Similar activation of glial cultures from different rat brain regions by neuroinflammatory stimuli and downregulation of the activation by a new class of small molecule ligands. *Neurobiol Aging* 2001;22(6):975-81.
131. Gehrman J, Banati RB, Kreutzberg GW. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol* 1993;48(2):189-98.
132. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;101(3):249-55.
133. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990;39(1):151-70.
134. Milligan CE, Cunningham TJ, Levitt P. Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1991;314(1):125-35.
135. Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 2006;29(2):68-74.
136. Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, et al. Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 2005;81(3):357-62.
137. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(9):3805-9.
138. Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1986;261(2):576-83.
139. Gallager DW, Mallorga P, Oertel W, Henneberry R, Tallman J. [3H]Diazepam binding in mammalian central nervous system: a pharmacological characterization. *J Neurosci* 1981;1(2):218-25.
140. Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci* 1983;32(16):1839-47.
141. Le Fur G, Guilloux F, Rufat P, Benavides J, Uzan A, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-(1-methylpropyl)-3 isoquinolinecarboxamide. II. In vivo studies. *Life Sci* 1983;32(16):1849-56.
142. Benavides J, Dubois A, Dennis T, Hamel E, Scatton B. Omega 3 (peripheral type benzodiazepine binding) site distribution in the rat immune system: an autoradiographic study with the photoaffinity ligand [3H]PK 14105. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;249(1):333-9.
143. Hirsch JD, Beyer CF, Malkowitz L, Loullis CC, Blume AJ. Characterization of ligand binding to mitochondrial benzodiazepine receptors. *Mol Pharmacol* 1989;35(1):164-72.
144. Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, et al. 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* 1983;41(6):1744-50.
145. Dubois A, Benavides J, Peny B, Duverger D, Fage D, et al. Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain Res* 1988;445(1):77-90.
 146. Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 1995;15(7 Pt 2):5263-74.
 147. Levivier M, Przedborski S. Quinolinic acid-induced lesions of the rat striatum: quantitative autoradiographic binding assessment. *Neurol Res* 1998;20(1):46-56.
 148. Grossman R, Shohami E, Alexandrovich A, Yatsiv I, Kloog Y, Biegon A. Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *Neuroimage* 2003;20(4):1971-81.
 149. Starosta-Rubinstein S, Ciliax BJ, Penney JB, McKeever P, Young AB. Imaging of a glioma using peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(3):891-5.
 150. Black KL, Ikezaki K, Toga AW. Imaging of brain tumors using peripheral benzodiazepine receptor ligands. *J Neurosurg* 1989;71(1):113-8.
 151. Vowinckel E, Reutens D, Becher B, Verge G, Evans A, 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):345-53.
 152. Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer 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 (Pt 11):2321-37.
 153. Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW. PK ('peripheral benzodiazepine')-binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [³H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol* 1997;26(2):77-82.
 154. Mankowski JL, Queen SE, Tarwater PJ, Adams RJ, Guilarte TR. Elevated peripheral benzodiazepine receptor expression in simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Neurovirol* 2003;9(1):94-100.
 155. Campioni EG, Nobrega JN, Sefton MV. HEMA/MMMA microcapsule implants in hemiparkinsonian rat brain: biocompatibility assessment using [³H]PK11195 as a marker for gliosis. *Biomaterials* 1998;19(7-9):829-37.
 156. Gouhier C, Chalon S, Venier-Julienne MC, Bodard S, Benoit J, et al. Neuroprotection of nerve growth factor-loaded microspheres on the D2 dopaminergic receptor positive-striatal neurones in quinolinic acid-lesioned rats: a quantitative autoradiographic assessment with iodobenzamide. *Neurosci Lett* 2000;288(1):71-5.
 157. Puschban Z, Waldner R, Seppi K, Stefanova N, Humpel C, et al. Failure of neuroprotection by embryonic striatal grafts in a double lesion rat model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *Exp Neurol* 2000;164(1):166-75.
 158. Raghavendra Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Dempsey RJ. 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* 2000;161(1):102-14.
 159. Rao VL, Bowen KK, Rao AM, Dempsey RJ. Up-regulation of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and [(3)H]PK11195 binding in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Neurosci Res* 2001;64(5):493-500.
 160. Benavides J, Cornu P, Dennis T, Dubois A, Hauw JJ, et al. Imaging of human brain lesions with an omega 3 site radioligand. *Ann Neurol* 1988;24(6):708-12.
 161. Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1990;11(5):874-8.
 162. Owen F, Poulter M, Waddington JL, Mashal RD, Crow TJ. [³H]R05-4864 and [³H]flunitrazepam binding in kainate-lesioned rat striatum and in temporal cortex of brains from patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 1983;278(1-2):373-5.
 163. McGeer EG, Singh EA, McGeer PL. Peripheral-type benzodiazepine binding in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1988;2(4):331-6.

164. Diorio D, Welner SA, Butterworth RF, Meaney MJ, Suranyi-Cadotte BE. Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex. *Neurobiol Aging* 1991;12(3):255-8.
165. Messmer K, Reynolds GP. Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* 1998;241(1):53-6.
166. Schoemaker H, Morelli M, Deshmukh P, Yamamura HI. [³H]Ro5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia. *Brain Res* 1982;248(2):396-401.
167. Kumlien E, Hilton-Brown P, Spannare B, Gillberg PG. In vitro quantitative autoradiography of [³H]-L-deprenyl and [³H]-PK 11195 binding sites in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 1992;33(4):610-7.
168. 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.
169. Altar CA, Baudry M. Systemic injection of kainic acid: gliosis in olfactory and limbic brain regions quantified with [³H]PK 11195 binding autoradiography. *Exp Neurol* 1990;109(3):333-41.
170. Guilarte TR, Kuhlmann AC, O'Callaghan JP, Miceli RC. Enhanced expression of peripheral benzodiazepine receptors in trimethyltin-exposed rat brain: a biomarker of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1995;16(3):441-50.
171. Kuhlmann AC, Guilarte TR. The peripheral benzodiazepine receptor is a sensitive indicator of domoic acid neurotoxicity. *Brain Res* 1997;751(2):281-8.
172. Kuhlmann AC, Guilarte TR. Regional and temporal expression of the peripheral benzodiazepine receptor in MPTP neurotoxicity. *Toxicol Sci* 1999;48(1):107-16.
173. Benavides J, Capdeville C, Dauphin F, Dubois A, Duverger D, et al. The quantification of brain lesions with an omega 3 site ligand: a critical analysis of animal models of cerebral ischaemia and neurodegeneration. *Brain Res* 1990;522(2):275-89.
174. Demerle-Pallardy C, Duverger D, Spinnewyn B, Pirotzky E, Braquet P. Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat: effect of neuroprotective drugs. *Brain Res* 1991;565(2):312-20.
175. Gotti B, Benavides J, MacKenzie ET, Scatton B. The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res* 1990;522(2):290-307.
176. Myers R, Manjil LG, Frackowiak RS, Cremer JE. [³H]PK 11195 and the localisation of secondary thalamic lesions following focal ischaemia in rat motor cortex. *Neurosci Lett* 1991;133(1):20-4.
177. Chen MK, Baidoo K, Verina T, Guilarte TR. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain* 2004;127(Pt 6):1379-92.
178. Weissman BA, Brandeis R, Gilat E, Cohen G, Alkalay D, et al. Monitoring drug-induced neurodegeneration by imaging of peripheral benzodiazepine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025:584-9.
179. Antkiewicz-Michaluk L, Mukhin AG, Guidotti A, Krueger KE. Purification and characterization of a protein associated with peripheral-type benzodiazepine binding sites. *J Biol Chem* 1988;263(33):17317-21.
180. Riond J, Vita N, Le Fur G, Ferrara P. Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 1989;245(1-2):238-44.
181. Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 2002;40(6):475-86.
182. Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* 1999;51(4):629-50.
183. Krueger KE, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1990;265(25):15015-22.
184. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(8):402-9.

185. Papadopoulos V, Mukhin AG, Costa E, Krueger KE. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem* 1990;265(7):3772-9.
186. Papadopoulos V, Guarneri P, Kreuger KE, Guidotti A, Costa E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(11):5113-7.
187. Cavallaro S, Korneyev A, Guidotti A, Costa E. Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(22):10598-602.
188. Romeo E, Cavallaro S, Korneyev A, Kozikowski AP, Ma D, et al. Stimulation of brain steroidogenesis by 2-aryl-indole-3-acetamide derivatives acting at the mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267(1):462-71.
189. Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, et al. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(3):828-37.
190. Choi HB, Khoo C, Ryu JK, van Breemen E, Kim SU, McLarnon JG. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor-alpha and [Ca²⁺]_i responses in human microglia by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. *J Neurochem* 2002;83(3):546-55.
191. Wilms H, Claasen J, Rohl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 2003;14(3):417-24.
192. Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiol Dis* 2005;20(2):550-61.
193. Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *J Neurosci Res* 2005;80(1):129-37.
194. Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Translocator protein (18 kDa) is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia* 2007.
195. Mizoule J, Gauthier A, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, et al. Opposite effects of two ligands for peripheral type benzodiazepine binding sites, PK 11195 and RO5-4864, in a conflict situation in the rat. *Life Sci* 1985;36(11):1059-68.
196. Benavides J, Guilloux F, Allam DE, Uzan A, Mizoule J, et al. Opposite effects of an agonist, RO5-4864, and an antagonist, PK 11195, of the peripheral type benzodiazepine binding sites on audiogenic seizures in DBA/2J mice. *Life Sci* 1984;34(26):2613-20.
197. Weissman BA, Cott J, Jackson JA, Bolger GT, Weber KH, et al. "Peripheral-type" binding sites for benzodiazepines in brain: relationship to the convulsant actions of Ro 5-4864. *J Neurochem* 1985;44(5):1494-9.
198. Gee KW. Phenylquinolines PK 8165 and PK 9084 allosterically modulate [³⁵S]-butylbicyclopentylphosphorothionate binding to a chloride ionophore in rat brain via a novel Ro5 4864 binding site. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240(3):747-53.
199. Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 2006;138(3):749-56.
200. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):273-86.
201. Avital A, Richter-Levin G, Leschiner S, Spanier I, Veenman L, et al. Acute and repeated swim stress effects on peripheral benzodiazepine receptors in the rat hippocampus, adrenal, and kidney. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(5):669-78.
202. Rao VL, Butterworth RF. Characterization of binding sites for the omega3 receptor ligands [³H]PK11195 and [³H]RO5-4864 in human brain. *Eur J Pharmacol* 1997;340(1):89-99.
203. Farges R, Joseph-Liauzun E, Shire D, Caput D, Le Fur G, Ferrara P. Site-directed mutagenesis of the peripheral benzodiazepine receptor: identification of amino acids implicated in the binding site of Ro5-4864. *Mol Pharmacol* 1994;46(6):1160-7.

204. Cremer JE, Hume SP, Cullen BM, Myers R, Manjil LG, et al. The distribution of radioactivity in brains of rats given [N-methyl-11C]PK 11195 in vivo after induction of a cortical ischaemic lesion. *Int J Rad Appl Instrum B* 1992;19(2):159-66.
205. Benavides J, Guilloux F, Rufat P, Uzan A, Renault C, et al. In vivo labelling in several rat tissues of 'peripheral type' benzodiazepine binding sites. *Eur J Pharmacol* 1984;99(1):1-7.
206. Myers R, Manjil LG, Cullen BM, Price GW, Frackowiak RS, Cremer JE. Macrophage and astrocyte populations in relation to [3H]PK 11195 binding in rat cerebral cortex following a local ischaemic lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11(2):314-22.
207. Turton DR, Pike VW, Cartoon M, Widdowson DA. Preparation of a Potential Marker for Glial-Cells - (N-Methyl-C-11)Ro5-4864. *J Labelled Compd Rad* 1984;21(11-1):1209-10.
208. Camsonne R, Crouzel C, Comar D, Maziere M, Prenant C, et al. Synthesis of N-(C-11) Methyl, N-(Methyl-1 Propyl), (Chloro-2 Phenyl)-1 Isoquinoline Carboxamide-3 (Pk-11195) - a New Ligand for Peripheral Benzodiazepine Receptors. *J Labelled Compd Rad* 1984;21(10):985-91.
209. Pestourie C. Sélection d'aptamères par approche combinatoire : De nouveaux radioligands pour l'Imagerie Moléculaire in vivo (Thèse de doctorat): Université Paris 5; 2005.
210. Myers R, Hume S. Small animal PET. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12(6):545-55.
211. Heiss WD, Herholz K. Brain receptor imaging. *J Nucl Med* 2006;47(2):302-12.
212. Lammertsma AA, Hume SP. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage* 1996;4(3 Pt 1):153-8.
213. Lammertsma AA, Bench CJ, Hume SP, Osman S, Gunn K, et al. Comparison of methods for analysis of clinical [11C]raclopride studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16(1):42-52.
214. Bergstrom M, Mosskin M, Ericson K, Ehrin E, Thorell JO, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites in human gliomas evaluated with positron emission tomography. *Acta Radiol Suppl* 1986;369:409-11.
215. Junck L, Olson JM, Ciliax BJ, Koeppe RA, Watkins GL, et al. PET imaging of human gliomas with ligands for the peripheral benzodiazepine binding site. *Ann Neurol* 1989;26(6):752-8.
216. Pappata S, Cornu P, Samson Y, Prenant C, Benavides J, et al. PET study of carbon-11-PK 11195 binding to peripheral type benzodiazepine sites in glioblastoma: a case report. *J Nucl Med* 1991;32(8):1608-10.
217. Doble A, Malgouris C, Daniel M, Daniel N, Imbault F, et al. Labelling of peripheral-type benzodiazepine binding sites in human brain with [3H]PK 11195: anatomical and subcellular distribution. *Brain Res Bull* 1987;18(1):49-61.
218. Kenny BA, MacKinnon AC, Spedding M, Brown CM. Changes in [3H]-PK 11195 and [3H]-8-OH-DPAT binding following forebrain ischaemia in the gerbil. *Br J Pharmacol* 1993;109(2):437-42.
219. Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. 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* 1994;21(4):573-81.
220. Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: From pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 2006.
221. Kuhlmann AC, Guilarte TR. Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem* 2000;74(4):1694-704.
222. Rojas S, Martin A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, et al. 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* 2007.
223. Banati RB. Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 2002;40(2):206-17.
224. Kassiou M, Meikle SR, Banati RB. Ligands for peripheral benzodiazepine binding sites in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):207-10.
225. de Vries EF, van Waarde A, Buursma AR, Vaalburg W. Synthesis and in vivo evaluation of 18F-desbromo-DuP-697 as a PET tracer for cyclooxygenase-2 expression. *J Nucl Med* 2003;44(10):1700-6.
226. Majo VJ, Prabhakaran J, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Kumar JS. A general method for the synthesis of aryl [11C]methylsulfones: potential PET probes for imaging cyclooxygenase-2 expression. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(19):4268-71.

227. McCarthy TJ, Sheriff AU, Graneto MJ, Talley JJ, Welch MJ. Radiosynthesis, in vitro validation, and in vivo evaluation of 18F-labeled COX-1 and COX-2 inhibitors. *J Nucl Med* 2002;43(1):117-24.
228. Prabhakaran J, Underwood MD, Parsey RV, Arango V, Majo VJ, et al. Synthesis and in vivo evaluation of [18F]-4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide as a PET imaging probe for COX-2 expression. *Bioorg Med Chem* 2007;15(4):1802-7.
229. Wust FR, Hohne A, Metz P. Synthesis of 18F-labelled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors via Stille reaction with 4-[18F]fluoroiodobenzene as radiotracers for positron emission tomography (PET). *Org Biomol Chem* 2005;3(3):503-7.
230. de Vries EF, Vroegh J, Dijkstra G, Moshage H, Elsinga PH, et al. Synthesis and evaluation of a fluorine-18 labeled antisense oligonucleotide as a potential PET tracer for iNOS mRNA expression. *Nucl Med Biol* 2004;31(5):605-12.
231. Pomper MG, Musachio JL, Scheffel U, Macdonald JE, McCarthy DJ, et al. Radiolabeled neuronal nitric oxide synthase inhibitors: synthesis, in vivo evaluation, and primate PET studies. *J Nucl Med* 2000;41(8):1417-25.
232. Zhang J, McCarthy TJ, Moore WM, Currie MG, Welch MJ. Synthesis and evaluation of two positron-labeled nitric oxide synthase inhibitors, S-[11C]methylisothiourea and S-(2-[18F]fluoroethyl)isothiourea, as potential positron emission tomography tracers. *J Med Chem* 1996;39(26):5110-8.
233. Zhang J, Xu M, Dence CS, Sherman EL, McCarthy TJ, Welch MJ. 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* 1997;38(8):1273-8.
234. Hayakawa T, Chang MC, Bell JM, Seeman R, Rapoport SI, Appel NM. Fatty acid incorporation depicts brain activity in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1998;807(1-2):177-81.
235. Giovacchini G, Lerner A, Toczek MT, Fraser C, Ma K, et al. Brain incorporation of 11C-arachidonic acid, blood volume, and blood flow in healthy aging: a study with partial-volume correction. *J Nucl Med* 2004;45(9):1471-9.
236. Esposito G, Giovacchini G, Der M, Liow JS, Bhattacharjee AK, et al. Imaging signal transduction via arachidonic acid in the human brain during visual stimulation, by means of positron emission tomography. *Neuroimage* 2007;34(4):1342-51.
237. De Reuck J, Santens P, Keppens J, De Bleecker J, Strijckmans K, et al. Cobalt-55 positron emission tomography in recurrent ischaemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 1999;101(1):15-8.
238. De Reuck J, Stevens H, Jansen H, Keppens J, Strijckmans K, et al. The significance of cobalt-55 positron emission tomography in ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 1999;8(1):17-21.
239. De Reuck J, Santens P, Strijckmans K, Lemahieu I. Cobalt-55 positron emission tomography in vascular dementia: significance of white matter changes. *J Neurol Sci* 2001;193(1):1-6.
240. Stevens H, Jansen HM, De Reuck J, Lemmerling M, Strijckmans K, et al. 55Cobalt (Co) as a PET-tracer in stroke, compared with blood flow, oxygen metabolism, blood volume and gadolinium-MRI. *J Neurol Sci* 1999;171(1):11-8.
241. Stevens H, Van de Wiele C, Santens P, Jansen HM, De Reuck J, et al. Cobalt-57 and technetium-99m-HMPAO-labeled leukocytes for visualization of ischemic infarcts. *J Nucl Med* 1998;39(3):495-8.
242. Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des* 2004;10(13):1493-503.
243. Ikoma Y, Takano A, Ito H, Kusuhara H, Sugiyama Y, et al. Quantitative analysis of 11C-verapamil transfer at the human blood-brain barrier for evaluation of P-glycoprotein function. *J Nucl Med* 2006;47(9):1531-7.
244. Lee YJ, Maeda J, Kusuhara H, Okauchi T, Inaji M, et al. In vivo evaluation of P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in nonhuman primates using [11C]verapamil. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):647-53.

245. Takano A, Kusuhara H, Suhara T, Ieiri I, Morimoto T, et al. Evaluation of in vivo P-glycoprotein function at the blood-brain barrier among MDR1 gene polymorphisms by using ¹¹C-verapamil. *J Nucl Med* 2006;47(9):1427-33.
246. Langer O, Bauer M, Hammers A, Karch R, Patarala E, et al. Pharmacoresistance in Epilepsy: A Pilot PET Study with the P-Glycoprotein Substrate R-[¹¹C]verapamil. *Epilepsia* 2007.
247. Toornvliet R, van Berckel BN, Luurtsema G, Lubberink M, Geldof AA, et al. Effect of age on functional P-glycoprotein in the blood-brain barrier measured by use of (R)-[¹¹C]verapamil and positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(6):540-8.
248. van Eerd JE, Boerman OC, Corstens FH, Oyen WJ. Radiolabeled chemotactic cytokines: new agents for scintigraphic imaging of infection and inflammation. *Q J Nucl Med* 2003;47(4):246-55.
249. Buscombe JR. The future of infection imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006;50(2):99-103.
250. Bleeker-Rovers CP, Rennen HJ, Boerman OC, Wymenga AB, Visser EP, et al. ^{99m}Tc-labeled interleukin 8 for the scintigraphic detection of infection and inflammation: first clinical evaluation. *J Nucl Med* 2007;48(3):337-43.
251. Himmelreich U, Weber R, Ramos-Cabrer P, Wegener S, Kandal K, et al. Improved stem cell MR detectability in animal models by modification of the inhalation gas. *Mol Imaging* 2005;4(2):104-9.
252. Guadagno JV, Warburton EA, Jones PS, Day DJ, Aigbirhio FI, et al. How affected is oxygen metabolism in DWI lesions?: A combined acute stroke PET-MR study. *Neurology* 2006;67(5):824-9.
253. Jiang Q, Ewing JR, Zhang ZG, Zhang RL, Hu J, et al. Magnetization transfer MRI: application to treatment of middle cerebral artery occlusion in rat. *J Magn Reson Imaging* 2001;13(2):178-84.
254. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Deliolanis N, Novikov M, Aikawa E, et al. Fluorescence tomography and magnetic resonance imaging of myocardial macrophage infiltration in infarcted myocardium in vivo. *Circulation* 2007;115(11):1384-91.
255. Wiart M, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharaffie S, et al. MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia. *Stroke* 2007;38(1):131-7.
256. Barber PA, Foniok T, Kirk D, Buchan AM, Laurent S, et al. MR molecular imaging of early endothelial activation in focal ischemia. *Ann Neurol* 2004;56(1):116-20.
257. Sibson NR, Blamire AM, Bernades-Silva M, Laurent S, Boutry S, et al. MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation. *Magn Reson Med* 2004;51(2):248-52.
258. Sipkins DA, Gijbels K, Tropper FD, Bednarski M, Li KC, Steinman L. ICAM-1 expression in autoimmune encephalitis visualized using magnetic resonance imaging. *J Neuroimmunol* 2000;104(1):1-9.
259. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, Sosnovik DE, Aikawa E, et al. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* 2006;114(14):1504-11.
260. Lindner JR, Coggins MP, Kaul S, Klibanov AL, Brandenburger GH, Ley K. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes. *Circulation* 2000;101(6):668-75.
261. Weller GE, Lu E, Csikari MM, Klibanov AL, Fischer D, et al. Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation* 2003;108(2):218-24.
262. Hamilton A, Huang SL, Warnick D, Stein A, Rabbat M, et al. Left ventricular thrombus enhancement after intravenous injection of echogenic immunoliposomes: studies in a new experimental model. *Circulation* 2002;105(23):2772-8.
263. Lindner JR, Dayton PA, Coggins MP, Ley K, Song J, et al. Noninvasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles. *Circulation* 2000;102(5):531-8.
264. Reinhardt M, Hauff P, Briel A, Uhlendorf V, Linker RA, et al. Sensitive particle acoustic quantification (SPAQ): a new ultrasound-based approach for the quantification of ultrasound contrast media in high concentrations. *Invest Radiol* 2005;40(1):2-7.
265. Hauff P, Reinhardt M, Briel A, Debus N, Schirner M. Molecular targeting of lymph nodes with L-selectin ligand-specific US contrast agent: a feasibility study in mice and dogs. *Radiology* 2004;231(3):667-73.

266. Reinhardt M, Hauff P, Linker RA, Briel A, Gold R, et al. Ultrasound derived imaging and quantification of cell adhesion molecules in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by Sensitive Particle Acoustic Quantification (SPAQ). *Neuroimage* 2005;27(2):267-78.
267. Berr C, Wancata J, Ritchie K. Prevalence of dementia in the elderly in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15(4):463-71.
268. Delacourte A. [Natural and molecular history of Alzheimer disease]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000;58(3):350-5.
269. McGowan E, Eriksen J, Hutton M. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 2006;22(5):281-9.
270. Golde TE, Dickson D, Hutton M. Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2006;3(5):421-30.
271. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, et al. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408(6815):979-82.
272. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003;9(4):448-52.
273. Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 2002;40(2):260-9.
274. Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22(6):903-8.
275. McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 2007;28(5):639-47.
276. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 2006;12(9):1005-15.
277. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21(3):383-421.
278. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Dev Neurosci* 2006;24(2-3):157-65.
279. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2005;2:22.
280. Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2004;3(9):519-27.
281. Golde TE, Bacskai BJ. Bringing amyloid into focus. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):552-4.
282. Jack CR, Jr., Garwood M, Wengenack TM, Borowski B, Curran GL, et al. In vivo visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1263-71.
283. Sigurdsson EM, Wadghiri YZ, Mosconi L, Blind JA, Knudsen E, et al. A non-toxic ligand for voxel-based MRI analysis of plaques in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2007.
284. Bacskai BJ, Hickey GA, Skoch J, Kajdasz ST, Wang Y, et al. Four-dimensional multiphoton imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid-beta ligand in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12462-7.
285. Hintersteiner M, Enz A, Frey P, Jatton AL, Kinzy W, et al. In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):577-83.
286. Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8(4):527-33.
287. Nordberg A. Amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 2007;20(4):398-402.
288. Nelissen N, Vandenbulcke M, Fannes K, Verbruggen A, Peeters R, et al. Abeta amyloid deposition in the language system and how the brain responds. *Brain* 2007;130(Pt 8):2055-69.
289. Kempainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, et al. PET amyloid ligand [11C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology* 2007;68(19):1603-6.

290. Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP, Racine CA, Mormino EC, et al. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2007;68(15):1205-12.
291. Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomquist G, Hagman G, et al. PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2007.
292. Ng S, Villemagne VL, Berlangieri S, Lee ST, Cherk M, et al. Visual assessment versus quantitative assessment of 11C-PIB PET and 18F-FDG PET for detection of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 2007;48(4):547-52.
293. Zheng M-Q, Yin D-Z, Zhang L, Cheng D-F, Wang Y-X, Cai H-C. Synthesis and evaluation of 18F-labeled PIB as amyloid imaging agents. *J Label Comp Radiopharm* 2007;50:S401.
294. Berndt U, Stanetty C, Berger M, Kvaternik H, Wolf T, et al. Synthesis and evaluation of [¹⁸F]FBTA, a potential amyloid agent. *J Label Comp Radiopharm* 2007;50:S86.
295. Mason NS, Klunk W, Debnath M, Flatt N, Huang G, et al. Synthesis and evaluation of [¹⁸F]PIB analogs as A β plaque PET imaging agents. *J Label Comp Radiopharm* 2007;50:S87.
296. Groom GN, Junck L, Foster NL, Frey KA, Kuhl DE. PET of peripheral benzodiazepine binding sites in the microgliosis of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 1995;36(12):2207-10.
297. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 2001;358(9280):461-7.
298. Versijpt JJ, Dumont F, Van Laere KJ, Decoo D, Santens P, et al. Assessment of neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer's disease with radiolabelled PK11195 and single photon emission computed tomography. A pilot study. *Eur Neurol* 2003;50(1):39-47.
299. Cagnin A, Rossor M, Sampson EL, Mackinnon T, Banati RB. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2004;56(6):894-7.
300. Cagnin A, Kassiou M, Meikle SR, Banati RB. In vivo evidence for microglial activation in neurodegenerative dementia. *Acta Neurol Scand Suppl* 2006;185:107-14.
301. Ye L, Morgenstern JL, Gee AD, Hong G, Brown J, Lockhart A. Delineation of positron emission tomography imaging agent binding sites on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem* 2005;280(25):23599-604.
302. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998;339(15):1044-53.
303. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998;339(16):1130-43.
304. Kruger R, Eberhardt O, Riess O, Schulz JB. Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? *Trends Mol Med* 2002;8(5):236-40.
305. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002;68(5):325-40.
306. Liu B, Gao HM, Hong JS. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1065-73.
307. Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11 Suppl 1:S9-S15.
308. Hald A, Van Beek J, Lotharius J. Inflammation in Parkinson's disease: causative or epiphenomenal? *Subcell Biochem* 2007;42:249-79.
309. Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2007;13(18):1925-8.
310. Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003;60(8):1059-64.
311. DeKosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 2003;302(5646):830-4.
312. Brooks DJ. Neuroimaging in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004;1(2):243-54.
313. Parkinson Study Group. A multicenter assessment of dopamine transporter imaging with DOPASCAN/SPECT in parkinsonism. *Parkinson Study Group. Neurology* 2000;55(10):1540-7.
314. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 2005;57(2):176-9.

315. Bartels AL, Leenders KL. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: Evidence from animal models to human in vivo studies with [(11)C]-PK11195 PET. *Mov Disord* 2007.
316. Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57(2):168-75.
317. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 2002;15(6):991-8.
318. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006;21(2):404-12.
319. Gerhard A, Banati RB, Goerres GB, Cagnin A, Myers R, et al. [11C](R)-PK11195 PET imaging of microglial activation in multiple system atrophy. *Neurology* 2003;61(5):686-9.
320. Gerhard A, Watts J, Trender-Gerhard I, Turkheimer F, Banati RB, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in corticobasal degeneration. *Mov Disord* 2004;19(10):1221-6.
321. Gerhard A, Trender-Gerhard I, Turkheimer F, Quinn NP, Bhatia KP, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2006;21(1):89-93.
322. Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003;106(6):518-26.
323. Sablonniere B, Vuillaume I, Schraen-Maschke S. [Triplet expansion diseases]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000;58(3):356-60.
324. Rangone H, Humbert S, Saudou F. Huntington's disease: how does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic? *Pathol Biol (Paris)* 2004;52(6):338-42.
325. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet* 2007;369(9557):218-28.
326. Rachakonda V, Pan TH, Le WD. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? *Cell Res* 2004;14(5):347-58.
327. Douaud G, Gaura V, Ribeiro MJ, Lethimonnier F, Maroy R, et al. Distribution of grey matter atrophy in Huntington's disease patients: a combined ROI-based and voxel-based morphometric study. *Neuroimage* 2006;32(4):1562-75.
328. Kipps CM, Duggins AJ, Mahant N, Gomes L, Ashburner J, McCusker EA. Progression of structural neuropathology in preclinical Huntington's disease: a tensor based morphometry study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(5):650-5.
329. Herholz K, Heiss WD. Positron emission tomography in clinical neurology. *Mol Imaging Biol* 2004;6(4):239-69.
330. Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, et al. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(2):161-72.
331. Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, et al. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* 2006;66(11):1638-43.
332. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, et al. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 2007.
333. Touzani O, Roussel S, MacKenzie ET. The ischaemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 2001;14(1):83-8.
334. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998;56(2):149-71.
335. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 1998;51(3 Suppl 3):S62-8.
336. Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA. Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003;34(11):2543-8.
337. De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci* 1999;22(12):535-40.

338. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007;184(1-2):53-68.
339. Dirnagl U. Inflammation in stroke: the good, the bad, and the unknown. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004(47):87-99.
340. Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron JC. Imaging of acute stroke. *Lancet Neurol* 2006;5(9):755-68.
341. Schramm P, Schellinger PD, Klotz E, Kallenberg K, Fiebich JB, et al. Comparison of perfusion computed tomography and computed tomography angiography source images with perfusion-weighted imaging and diffusion-weighted imaging in patients with acute stroke of less than 6 hours' duration. *Stroke* 2004;35(7):1652-8.
342. Baron JC. Stroke research in the modern era: images versus dogmas. *Cerebrovasc Dis* 2005;20(3):154-63.
343. Heiss WD, Grond M, Thiel A, Ghaemi M, Sobesky J, et al. Permanent cortical damage detected by flumazenil positron emission tomography in acute stroke. *Stroke* 1998;29(2):454-61.
344. Rudin M, Mueggler T, Allegrini PR, Baumann D, Rausch M. Characterization of CNS disorders and evaluation of therapy using structural and functional MRI. *Anal Bioanal Chem* 2003;377(6):973-81.
345. Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of Polymorphonuclear Leukocyte Accumulation in Acute Cerebral Infarction and Their Correlation With Brain Tissue Damage. *Stroke* 1996;27(10):1739-43.
346. Price CJ, Menon DK, Peters AM, Ballinger JR, Barber RW, et al. Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study. *Stroke* 2004;35(7):1659-64.
347. Jander S, Schroeter M, Saleh A. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke* 2007;38(2 Suppl):642-5.
348. Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, et al. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke* 2007;38(2):303-7.
349. Ramsay SC, Weiller C, Myers R, Cremer JE, Luthra SK, et al. Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. *Lancet* 1992;339(8800):1054-5.
350. Baron JC. How healthy is the acutely reperfused ischemic penumbra? *Cerebrovasc Dis* 2005;20 Suppl 2:25-31.
351. Price CJ, Wang D, Menon DK, Guadagno JV, Cleij M, et al. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* 2006;37(7):1749-53.
352. Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, et al. In vivo imaging of activated microglia using [¹¹C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport* 2000;11(13):2957-60.
353. Pappata S, Lévassieur M, Gunn RN, Myers R, Cruzel C, et al. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [¹¹C]PK11195. *Neurology* 2000;55(7):1052-4.
354. Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [¹¹C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* 2005;24(2):591-5.
355. Lisak RP. Neurodegeneration in multiple sclerosis: defining the problem. *Neurology* 2007;68(22 Suppl 3):S5-12; discussion S43-54.
356. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343(13):938-52.
357. Wekerle H. [The enigma of arrival: [corrected] the entrance of auto-immune T lymphocytes in central nervous tissues and of their attack against the myelin structures]. *C R Biol* 2007;330(1):1-12.
358. Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;46(3):261-81.
359. Cross AH, Cannella B, Brosnan CF, Raine CS. Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. I. Localization of ¹⁴C-labeled cells during acute, chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 1990;63(2):162-70.
360. Flugel A, Bradl M. New tools to trace populations of inflammatory cells in the CNS. *Glia* 2001;36(2):125-36.

361. Martino G, Adorini L, Rieckmann P, Hillert J, Kallmann B, et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol* 2002;1(8):499-509.
362. Lee SJ, Benveniste EN. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999;98(2):77-88.
363. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 2005;64(8):1336-42.
364. Johnson KP. Natalizumab (Tysabri) treatment for relapsing multiple sclerosis. *Neurologist* 2007;13(4):182-7.
365. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121 (Pt 1):3-24.
366. Wayne Moore GR. MRI-clinical correlations: more than inflammation alone-what can MRI contribute to improve the understanding of pathological processes in MS? *J Neurol Sci* 2003;206(2):175-9.
367. Inglese M, Benedetti B, Filippi M. The relation between MRI measures of inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005;233(1-2):15-9.
368. Miller DH. Biomarkers and surrogate outcomes in neurodegenerative disease: lessons from multiple sclerosis. *NeuroRx* 2004;1(2):284-94.
369. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006;52(1):61-76.
370. Chavarria A, Alcocer-Varela J. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun Rev* 2004;3(4):251-60.
371. Bakshi R, Minagar A, Jaisani Z, Wolinsky JS. Imaging of multiple sclerosis: role in neurotherapeutics. *NeuroRx* 2005;2(2):277-303.
372. Debruyne JC, Van Laere KJ, Versijpt J, De Vos F, Eng JK, et al. Semiquantification of the peripheral-type benzodiazepine ligand [11C]PK11195 in normal human brain and application in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* 2002;102(3):127-35.
373. Debruyne JC, Versijpt J, Van Laere KJ, De Vos F, Keppens J, et al. PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using [11C]PK11195. *Eur J Neurol* 2003;10(3):257-64.
374. Versijpt J, Debruyne JC, Van Laere KJ, De Vos F, Keppens J, et al. Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study. *Mult Scler* 2005;11(2):127-34.
375. Banati RB, Goerres GW, Myers R, Gunn RN, Turkheimer FE, et al. [11C](R)-PK11195 positron emission tomography imaging of activated microglia in vivo in Rasmussen's encephalitis. *Neurology* 1999;53(9):2199-203.
376. Cagnin A, Myers R, Gunn RN, Lawrence AD, Stevens T, et al. In vivo visualization of activated glia by [11C] (R)-PK11195-PET following herpes encephalitis reveals projected neuronal damage beyond the primary focal lesion. *Brain* 2001;124(Pt 10):2014-27.
377. Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Bissel SJ, Mathis CA, et al. PET imaging of brain macrophages using the peripheral benzodiazepine receptor in a macaque model of neuroAIDS. *J Clin Invest* 2004;113(7):981-9.
378. Hammoud DA, Endres CJ, Chander AR, Guilarte TR, Wong DF, et al. Imaging glial cell activation with [11C]-R-PK11195 in patients with AIDS. *J Neurovirol* 2005;11(4):346-55.
379. Wiley CA, Lopresti BJ, Becker JT, Boada F, Lopez OL, et al. Positron emission tomography imaging of peripheral benzodiazepine receptor binding in human immunodeficiency virus-infected subjects with and without cognitive impairment. *J Neurovirol* 2006;12(4):262-71.
380. Gartner S, Liu Y. Insights into the role of immune activation in HIV neuropathogenesis. *J Neurovirol* 2002;8(2):69-75.
381. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 2004;15(3):601-9.
382. Turner MR, Gerhard A, Al-Chalabi A, Shaw CE, Hughes RA, et al. Mills' and other isolated upper motor neurone syndromes: in vivo study with 11C-(R)-PK11195 PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(6):871-4.

383. Cagnin A, Taylor-Robinson SD, Forton DM, Banati RB. In vivo imaging of cerebral "peripheral benzodiazepine binding sites" in patients with hepatic encephalopathy. *Gut* 2006;55(4):547-53.
384. <http://www.ifpma.org/clinicaltrials.html> ; identifiant NCT00205582.
385. <http://www.ifpma.org/clinicaltrials.html> ; identifiant NCT00205608.
386. Munn NA. Microglia dysfunction in schizophrenia: an integrative theory. *Med Hypotheses* 2000;54(2):198-202.
387. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: Elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res* 2006.
388. Chew LJ, Takanohashi A, Bell M. Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2006;12(2):105-12.
389. Sauvageau A, Desjardins P, Lozeva V, Rose C, Hazell AS, et al. Increased expression of "peripheral-type" benzodiazepine receptors in human temporal lobe epilepsy: implications for PET imaging of hippocampal sclerosis. *Metab Brain Dis* 2002;17(1):3-11.
390. Ashwood P, Van de Water J. Is autism an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 2004;3(7-8):557-62.
391. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005;57(1):67-81.
392. Kannan S, Saadani-Makki F, Muzik O, Chakraborty P, Mangner TJ, et al. Microglial activation in perinatal rabbit brain induced by intrauterine inflammation: detection with ¹¹C-(R)-PK11195 and small-animal PET. *J Nucl Med* 2007;48(6):946-54.
393. Kielian T, Hickey WF. Proinflammatory cytokine, chemokine, and cellular adhesion molecule expression during the acute phase of experimental brain abscess development. *Am J Pathol* 2000;157(2):647-58.
394. Kielian T. Immunopathogenesis of brain abscess. *J Neuroinflammation* 2004;1(1):16.
395. Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals* 2005;14(4):166-74.
396. DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist* 2004;10(1):40-52.
397. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1996;380(6572):345-7.
398. Anholt RR, Murphy KM, Mack GE, Snyder SH. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J Neurosci* 1984;4(2):593-603.
399. Schuitemaker A, van Berckel BN, Boellaard R, Kropholler MA, Jonker C, et al. Assessment of microglial activation in mild cognitive impairment using [¹¹C](R)-PK11195 and PET. *Neuroimage* 2006;31:T159.
400. Petit-Taboue MC, Baron JC, Barre L, Traverso JM, Speckel D, et al. Brain kinetics and specific binding of [¹¹C]PK 11195 to omega 3 sites in baboons: positron emission tomography study. *Eur J Pharmacol* 1991;200(2-3):347-51.
401. Cumming P, Pedersen MD, Minuzzi L, Mezzomo K, Danielsen EH, et al. Distribution of PK11195 binding sites in porcine brain studied by autoradiography in vitro and by positron emission tomography. *Synapse* 2006;59(7):418-26.
402. Cleij M, Aigbirhio F, Baron JC, Clark JC. Base-promoted dechlorination of (R)-[¹¹C]PK-11195. *J Label Comp Radiopharm* 2003;46:S588.
403. Lockhart A, Davis B, Matthews JC, Rahmoune H, Hong G, et al. 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* 2003;30(2):199-206.
404. Myers R, et al. Cluster analysis and the reference tissue model in the analysis of clinical [¹¹C]PK11195 PET. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(Suppl.1):S789.
405. Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Luurtsema G, et al. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[¹¹C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(7):842-51.

406. Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, Folkersma H, van Berckel BN, Lammertsma AA. Evaluation of reference tissue models for the analysis of [11C](R)-PK11195 studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(11):1431-41.
407. Kropholler MA, Boellaard R, van Berckel BN, Schuitemaker A, Kloet RW, et al. Evaluation of reference regions for (R)-[(11)C]PK11195 studies in Alzheimer's disease and Mild Cognitive Impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007.
408. Schuitemaker A, van Berckel BN, Kropholler MA, Kloet RW, Jonker C, et al. Evaluation of methods for generating parametric (R)-[(11)C]PK11195 binding images. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007.
409. Schuitemaker A, van Berckel BN, Kropholler MA, Veltman DJ, Scheltens P, et al. SPM analysis of parametric (R)-[(11)C]PK11195 binding images: Plasma input versus reference tissue parametric methods. *Neuroimage* 2007.
410. Turkheimer FE, Edison P, Pavese N, Roncaroli F, Anderson AN, et al. Reference and target region modeling of [11C]-(R)-PK11195 brain studies. *J Nucl Med* 2007;48(1):158-67.
411. Anderson AN, Pavese N, Edison P, Tai YF, Hammers A, et al. A systematic comparison of kinetic modelling methods generating parametric maps for [(11)C]-(R)-PK11195. *Neuroimage* 2007.
412. Kneuer C, Ehrhardt C, Radomski MW, Bakowsky U. Selectins--potential pharmacological targets? *Drug Discov Today* 2006;11(21-22):1034-40.
413. Harlan JM, Winn RK. Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med* 2002;30(5 Suppl):S214-9.
414. De Martinis M, Modesti M, Ginaldi L. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. *Immunol Cell Biol* 2004;82(4):415-20.
415. Thomas AJ, Ferrier IN, Kalara RN, Woodward SA, Ballard C, et al. Elevation in late-life depression of intercellular adhesion molecule-1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex. *Am J Psychiatry* 2000;157(10):1682-4.
416. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
417. Miller EA, Pankow JS, Millikan RC, Bray MS, Ballantyne CM, et al. Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2003;171(2):265-72.
418. Empana JP, Sykes DH, Luc G, Juhan-Vague I, Arveiler D, et al. Contributions of depressive mood and circulating inflammatory markers to coronary heart disease in healthy European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation* 2005;111(18):2299-305.
419. Chamorro A, Cervera A, Castillo J, Davalos A, Aponte JJ, Planas AM. Unfractionated heparin is associated with a lower rise of serum vascular cell adhesion molecule-1 in acute ischemic stroke patients. *Neurosci Lett* 2002;328(3):229-32.
420. Kraus J, Engelhardt B, Chatzimanolis N, Bauer R, Tofighi J, et al. Cell surface bound and soluble adhesion molecules in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-measures of subclinical disease severity and activity. *J Neuroimmunol* 2002;122(1-2):175-85.
421. McDonnell GV, McMillan SA, Douglas JP, Droogan AG, Hawkins SA. Serum soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: raised sVCAM-1, sICAM-1 and sE-selectin in primary progressive disease. *J Neurol* 1999;246(2):87-92.
422. Lee SJ, Park JY, Hou J, Benveniste EN. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia* 1999;25(1):21-32.
423. Rosenman SJ, Shrikant P, Dubb L, Benveniste EN, Ransohoff RM. Cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by astrocytes and astrocytoma cell lines. *J Immunol* 1995;154(4):1888-99.
424. Araki M, Araki K, Vassalli P. Cloning and sequencing of mouse VCAM-1 cDNA. *Gene* 1993;126(2):261-4.
425. Terry RW, Kwee L, Levine JF, Labow MA. Cytokine induction of an alternatively spliced murine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mRNA encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored VCAM protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(13):5919-23.

426. Dudgeon TJ, Bottomley MJ, Driscoll PC, Humphries MJ, Mould AP, et al. Expression and characterisation of a very-late antigen-4 (alpha 4 beta 1) integrin-binding fragment of vascular cell-adhesion molecule-1. *Eur J Biochem* 1994;226(2):517-23.
427. Casasnovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4134-9.
428. Bottomley MJ, Robinson RC, Driscoll PC, Harlos K, Stuart DI, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction characterisation of both a native and selenomethionyl VLA-4 binding fragment of VCAM-1. *J Mol Biol* 1994;244(4):464-8.
429. Jones EY, Harlos K, Bottomley MJ, Robinson RC, Driscoll PC, et al. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature* 1995;373(6514):539-44.
430. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor. *Virus Res* 1999;62(2):107-17.
431. Osborn L, Vassallo C, Browning BG, Tizard R, Haskard DO, et al. Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1). *J Cell Biol* 1994;124(4):601-8.
432. Clements JM, Newham P, Shepherd M, Gilbert R, Dudgeon TJ, et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 8):2127-35.
433. Wang JH, Pepinsky RB, Stehle T, Liu JH, Karpusas M, et al. The crystal structure of an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): a cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1-alpha 4 integrin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5714-8.
434. McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Immunol* 1999;163(7):3993-4000.
435. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158(4):1825-32.
436. Justicia C, Martin A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, et al. Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(3):421-32.
437. Gerszten RE, Lim YC, Ding HT, Snapp K, Kansas G, et al. Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells: implications for atherogenesis. *Circ Res* 1998;82(8):871-8.
438. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Ransohoff RM, Trapp BD. VCAM-1-positive microglia target oligodendrocytes at the border of multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61(6):539-46.
439. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
440. Yang Y, Jun CD, Liu JH, Zhang R, Joachimiak A, et al. Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface. *Mol Cell* 2004;14(2):269-76.
441. Jun CD, Shimaoka M, Carman CV, Takagi J, Springer TA. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(12):6830-5.
442. Jimenez D, Roda-Navarro P, Springer TA, Casasnovas JM. Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of intercellular adhesion molecules (ICAMs). *J Biol Chem* 2005;280(7):5854-61.
443. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 2005;56:555-83.
444. Pestourie C, Tavitian B, Duconge F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie* 2005;87(9-10):921-30.
445. Ulrich H, Alves MJ, Colli W. RNA and DNA aptamers as potential tools to prevent cell adhesion in disease. *Braz J Med Biol Res* 2001;34(3):295-300.

446. Jenison RD, Jennings SD, Walker DW, Bargatze RF, Parma D. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998;8(4):265-79.
447. O'Connell D, Koenig A, Jennings S, Hicke B, Han HL, et al. Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):5883-7.
448. Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S, Yu J. In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(1):237-43.
449. Hicke BJ, Watson SR, Koenig A, Lynott CK, Bargatze RF, et al. DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J Clin Invest* 1996;98(12):2688-92.
450. Bridonneau P, Chang YF, O'Connell D, Gill SC, Snyder DW, et al. High-affinity aptamers selectively inhibit human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (hnp-PLA2). *J Med Chem* 1998;41(6):778-86.
451. Biesecker G, Dihel L, Enney K, Bendele RA. Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* 1999;42(1-3):219-30.
452. Rhodes A, Deakin A, Spaul J, Coomber B, Aitken A, et al. The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem* 2000;275(37):28555-61.
453. Mi J, Zhang X, Giangrande PH, McNamara JO, 2nd, Nimjee SM, et al. Targeted inhibition of alphavbeta3 integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(2):956-63.
454. Marro ML, Daniels DA, McNamee A, Andrew DP, Chapman TD, et al. Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN-gamma-inducible CXCL10 chemokine. *Biochemistry* 2005;44(23):8449-60.
455. Marro ML, Daniels DA, Andrew DP, Chapman TD, Gearing KL. In vitro selection of RNA aptamers that block CCL1 chemokine function. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(1):270-6.
456. Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood* 1993;81(12):3271-6.
457. Rusconi CP, Scardino E, Layzer J, Pitoc GA, Ortel TL, et al. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* 2002;419(6902):90-4.
458. Lee SW, Sullenger BA. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(2):315-24.
459. Lee SW, Sullenger BA. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. *Nat Biotechnol* 1997;15(1):41-5.
460. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol* 1996;157(1):221-30.
461. Kubik MF, Bell C, Fitzwater T, Watson SR, Tasset DM. Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding. *J Immunol* 1997;159(1):259-67.
462. Santulli-Marotto S, Nair SK, Rusconi C, Sullenger B, Gilboa E. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res* 2003;63(21):7483-9.
463. Kim YM, Choi KH, Jang YJ, Yu J, Jeong S. Specific modulation of the anti-DNA autoantibody-nucleic acids interaction by the high affinity RNA aptamer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):516-23.
464. Ylera F, Lurz R, Erdmann VA, Furste JP. Selection of RNA aptamers to the Alzheimer's disease amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(5):1583-8.
465. Weiss S, Proske D, Neumann M, Groschup MH, Kretschmar HA, et al. RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* 1997;71(11):8790-7.
466. Faulhammer D, Eschgfäller B, Stark S, Burgstaller P, Englberger W, et al. Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ. *Rna* 2004;10(3):516-27.
467. Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klussmann S. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res* 2003;31(21):e130.

468. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997;3(8):894-9.
469. Ghosh G, Huang DB, Huxford T. Molecular mimicry of the NF-kappaB DNA target site by a selected RNA aptamer. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14(1):21-7.
470. Ueno T, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Nishimura M, Morishita R, et al. Nuclear factor-kappa B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: a future strategy for brain protection during circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122(4):720-7.
471. Charlton J, Kirschenheuter GP, Smith D. Highly potent irreversible inhibitors of neutrophil elastase generated by selection from a randomized DNA-valine phosphonate library. *Biochemistry* 1997;36(10):3018-26.
472. Bless NM, Smith D, Charlton J, Czermak BJ, Schmal H, et al. Protective effects of an aptamer inhibitor of neutrophil elastase in lung inflammatory injury. *Curr Biol* 1997;7(11):877-80.
473. Charlton J, Sennello J, Smith D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 1997;4(11):809-16.
474. Roivainen A, Tolvanen T, Salomaki S, Lendvai G, Velikyan I, et al. 68Ga-labeled oligonucleotides for in vivo imaging with PET. *J Nucl Med* 2004;45(2):347-55.
475. Dougan H, Hobbs JB, Weitz JI, Lyster DM. Synthesis and radioiodination of a stannyl oligodeoxyribonucleotide. *Nucleic Acids Res* 1997;25(14):2897-901.
476. Kuhnast B, Dolle F, Terrazzino S, Rousseau B, Loc'h C, et al. General method to label antisense oligonucleotides with radioactive halogens for pharmacological and imaging studies. *Bioconj Chem* 2000;11(5):627-36.
477. Watson SR, Chang YF, O'Connell D, Weigand L, Ringquist S, Parma DH. Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000;10(2):63-75.
478. Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 2004;21(12):2234-46.
479. Boomer RM, Lewis SD, Healy JM, Kurz M, Wilson C, McCauley TG. Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides* 2005;15(3):183-95.
480. Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, et al. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol* 2004;22(11):1423-8.
481. Willis MC, Collins BD, Zhang T, Green LS, Sebesta DP, et al. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconj Chem* 1998;9(5):573-82.
482. Boisgard R, Kuhnast B, Vonhoff S, Younes C, Hinnen F, et al. In vivo biodistribution and pharmacokinetics of 18F-labelled Spiegelmers: a new class of oligonucleotidic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32(4):470-7.
483. Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, et al. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* 2006;47(4):668-78.
484. Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Kelly KA, Patel P, Wolley A, et al. In vivo imaging of activated endothelium using an anti-VCAM-1 magneto-optical probe. *Bioconj Chem* 2005;16(3):576-81.
485. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ Res* 2005;96(3):327-36.
486. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003;270(8):1628-44.
487. Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, Laukoetter MG, Mennigen R, et al. ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51(4):529-35.
488. Suzuki T, Zhang Y, Zhang YF, Schlachetzki F, Pardridge WM. Imaging gene expression in regional brain ischemia in vivo with a targeted [¹¹¹In]-antisense radiopharmaceutical. *Mol Imaging* 2004;3(4):356-63.
489. Suzuki T, Wu D, Schlachetzki F, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Imaging endogenous gene expression in brain cancer in vivo with ¹¹¹In-peptide nucleic acid antisense radiopharmaceuticals and brain drug-targeting technology. *J Nucl Med* 2004;45(10):1766-75.

490. Lee HJ, Boado RJ, Braasch DA, Corey DR, Pardridge WM. Imaging gene expression in the brain in vivo in a transgenic mouse model of Huntington's disease with an antisense radiopharmaceutical and drug-targeting technology. *J Nucl Med* 2002;43(7):948-56.

B) APTAMERE ANTI-VCAM-1

L'expérience du Service Hospitalier Frédéric Joliot en matière de marquage d'oligonucléotides, ainsi que les premiers résultats sur la biodistribution des ARN modifiés, ont logiquement motivé ce projet de sélection d'un aptamère contre une cible d'intérêt pour la neuroinflammation. Cette approche du développement de radiotraceurs est originale à plus d'un titre : par la méthode d'obtention d'un ligand (stratégie combinatoire), par la nature de celui-ci (oligonucléotide), et par la cible choisie (surface endothéliale, et non parenchyme cérébral). La présentation des résultats obtenus comporte un article, ainsi que des données non publiées, dont l'ensemble est discuté à la fin de ce chapitre.

1) Résultats

1-1) Sélection d'un aptamère contre le fragment N-terminal de VCAM-1

L'article présente la stratégie de sélection originelle, entièrement réalisé *in vitro*, grâce à l'expression et la purification d'un fragment de la partie extracellulaire de VCAM-1. Les conditions et résultats de la sélection sont décrits, ainsi que la mesure de l'affinité d'un aptamère largement amplifié.

Chauveau, F.; Aissouni, Y.; Hamm, J.; Boutin, H.; Libri, D.; Ducongé, F.; Tavitian, B., Binding of an aptamer to the N-terminal fragment of VCAM-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (**En révision**).

Résumé

Une sélection *in vitro* d'aptamères 2'-fluoro-oligonucléotidiques a été menée contre le fragment N-terminal à deux domaines de la protéine VCAM-1 de souris. La procédure de sélection (méthode SELEX) a permis un enrichissement au sein de la banque d'oligonucléotides de départ d'une famille de séquences homologues. Une excellente affinité (10 nM) de l'un des membres de cette famille, l'aptamère 12.11, a été démontrée par un test de liaison sur filtre.

Texte intégral :

Chauveau F, Aissouni Y, Hamm J, Boutin H, Libri D, Ducongé F, Tavitian B. Binding of an aptamer to the N-terminal fragment of VCAM-1. *Bioorg Med Chem Lett*. **2007**;17(22):6119-6122. doi:[10.1016/j.bmcl.2007.09.046](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.046)

1-2) Données supplémentaires

L'excellente affinité de l'aptamère 12.11 pour sa cible (constante de dissociation nanomolaire), ainsi que sa nature chimique (ARN modifié en 2'-fluoro-pyrimidine) suggérait que la sélection effectuée pouvait fournir un outil directement utilisable *in vivo*, c'est-à-dire chez l'animal. Auparavant, il fallait confirmer l'affinité de l'aptamère pour sa cible non plus fragmentaire, mais native. Cette partie décrit donc principalement des expériences menées sur cultures cellulaires exprimant VCAM-1.

1-2-1) Caractérisation de la liaison à VCAM-1 native

La lignée IP2-E4 (ATCC number : CRL-2171 [<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-2171>]) a été acquise par le laboratoire. Elle provient de l'épithélium vasculaire d'un ganglion lymphatique axillaire de souris, transformé par le virus simien SV40 (1), et cloné (2). Les cellules sont donc de type endothéliales, adhérentes, et tumorigéniques (3). VCAM-1 est faiblement exprimée de manière constitutive, mais sur-exprimée par une stimulation proinflammatoire au TNF- α .

L'expression cellulaire de VCAM-1 a été caractérisée par immunocytochimie en utilisant l'anticorps monoclonal MAVCM5 (Pierce) et différentes doses uniques de TNF- α ajoutées au milieu de culture pendant 24h (fig. 1).

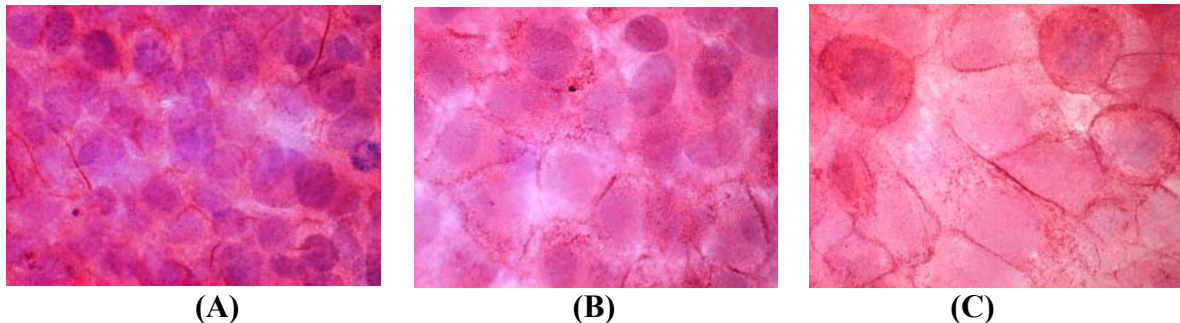


Figure 1. Marquage immunocytochimique (en brun) de VCAM-1 sur la lignée IP2-E4 contre-colorée à l'éosine/hématoxyline. (A) cellules non traitées (B) 1 ng/ml TNF- α (C) 10 ng/ml TNF- α

L'expression est membranaire et un niveau basal est détectable. Une dose de 1 ng de TNF- α par puit, soit 1 ng par ml de milieu de culture semble être sans effet sur l'expression de VCAM-1, alors que le marquage est visiblement plus important avec 10 ng par puit. En revanche, 100 ng de TNF- α conduit au décollement complet du tapis cellulaire. Ces résultats ont été confirmés en Western-Blot en utilisant l'anticorps polyclonal sc-1504 (Santa-Cruz) : l'activation est efficace et reproductible à 10 ng/ml, alors qu'une dose plus faible (1 ng/ml) est sans effet sur l'expression de VCAM-1 (fig. 2), et qu'une dose plus importante (50-100 ng/ml) peut fournir une expression plus élevée, mais favorise le décollement des cellules. L'adhésion des cellules étant critique lors des procédures de test de liaison sur cultures (cf ci-dessous), la dose de 10 ng/ml offre un bon compromis.

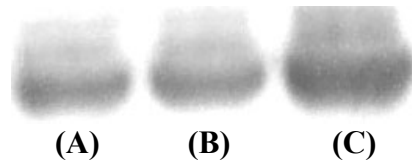


Figure 2. Détection de VCAM-1 par Western-Blot sur cellules IP2-E4.
 (A) cellules non traitées (B) 1 ng/ml TNF- α (C) 10 ng/ml TNF- α

La dynamique de cette sur-expression de VCAM-1 a également été étudiée de manière semi-quantitative en Western-Blot, dont les résultats d'une expérience représentative sont représentés figure 3 : si le temps de traitement n'est pas critique (l'effet observé dès 6h après le début du traitement est similaire à celui obtenu après 24h de traitement), la confluence des cellules est requise pour obtenir une stimulation maximale, et l'expression de VCAM-1 est alors augmentée d'un facteur 4 (3,5-4,5) par rapport au niveau basal.

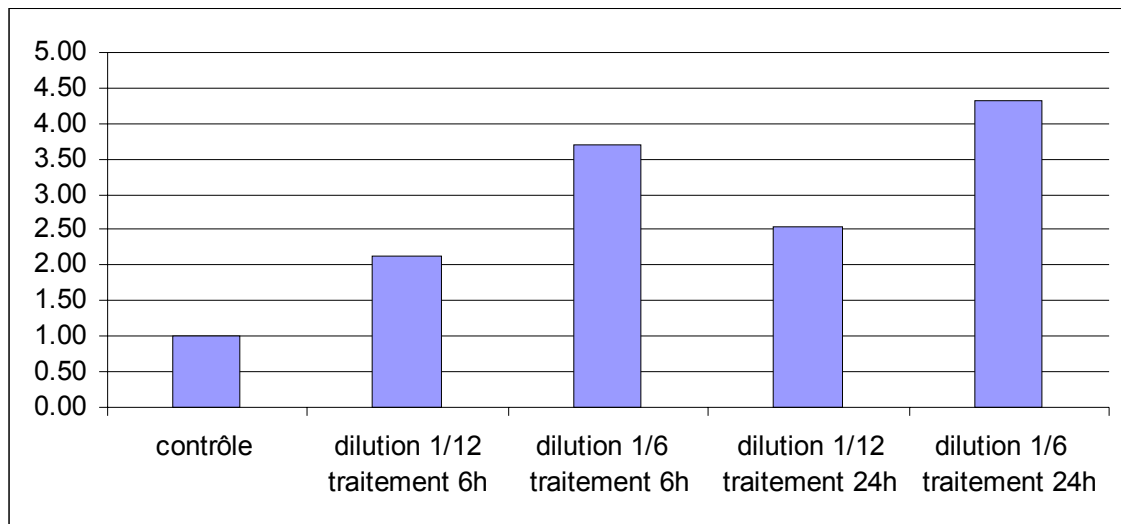


Figure 3. Quantification relative de l'induction de VCAM-1 par 10 ng/ml de TNF- α détectée en Western-Blot. Les cellules passées au 1/6 ont été traitées à confluence, alors que celles passées au 1/12 formaient un tapis cellulaire clairsemé.

L'étude de la liaison de l'aptamère 12.11 aux cellules a été réalisée sur cellules adhérentes cultivées en plaques 24 puits, incubées avec des concentrations croissantes d'aptamères radiomarqué au phosphore 32. Ce protocole original est largement maîtrisé au laboratoire (4), où des conditions d'incubation (dans un volume de 200 μ l, suffisant pour recouvrir entièrement la surface d'un puit), de lavage (rapide aspiration du milieu à la pipette pasteur), et de comptage de la radioactivité liée (après lyse des cellules) avaient déjà été validées. La stabilité des 2'F-Py-ARNs uniformément radiomarqués au GTP α ³²P (intact jusqu'à 2 heures) et radiomarqués à l'extrémité 5' par l'ATP γ ³²P (70% intact à 40 min) a été également confirmée, définissant ainsi un temps d'incubation moyen (15 min à 30 min maximum).

L'influence d'un certain nombre de facteurs supplémentaires a été examinée.

- a. Le milieu d'incubation et de lavage :

- milieu de culture des cellules (DMEM, sans sérum ajouté) afin de ne pas perturber l'adhésion cellulaire ;
 - milieu dans lequel a été réalisée la sélection des aptamères (RPMI) afin de conserver les conditions ioniques originelles, susceptibles d'influer sur la conformation des oligonucléotides ;
 - tampons préparés (Tris pH 7,4 - NaCl - CaCl₂ - MgCl₂).
- b. La température d'incubation : 4°C (bloquant une éventuelle accumulation intracellulaire de l'aptamère par endocytose), 37°C (température de sélection de l'aptamère, et de culture des cellules), ou température ambiante.
 - c. Le choix du support : la lignée est naturellement adhérente aux boîtes plastiques commerciales, mais l'emploi de plaques couvertes au collagène a permis de renforcer l'adhésion et de limiter la variabilité induite par le décollement des cellules.
 - d. Le nombre de lavages : typiquement, 5 lavages sont réalisés pour minimiser efficacement la liaison non spécifique et les interactions de faible affinité sans perturber le tapis cellulaire.
 - e. Le choix d'un compétiteur non spécifique, dont l'emploi limite le signal non-spécifique ou de faible affinité commun aux oligonucléotides, et la concentration de ce compétiteur : l'albumine, le sérum de chèvre, le sérum de veau fœtal, l'ADN de sperme de saumon (ADNss), l'ARN de transfert (ARNt), le poly-inosine (polyI), ou un détergent (SDS, Tween 20, Triton X, NET).
 - f. L'estimation du signal non-spécifique par la banque initiale d'oligonucléotides ou par un aptamère de même composition que 12.11 mais de séquence aléatoire, dit « scramble » (1211scr).
 - g. La gamme de concentration en aptamère : des concentrations de 100 pM à 500µM ont été explorées.
 - h. L'effet du traitement au TNF- α selon le protocole et la dose sélectionnée : typiquement, les cellules à confluence sont traitées (10 ng/ml) la veille au soir ou le matin même, soit 6-20h de traitement.
 - i. Une étape de pré-lavage des cellules a été ajoutée pour éliminer les résidus de sérum et sVCAM-1 éventuellement libérée sous l'effet du traitement.

L'ensemble de ces paramètres s'est révélée sans grande influence sur l'allure des courbes de liaison des aptamère aux cellules IP2-E4. La banque initiale ou l'aptamère 12.11scr se lient de manière linéaire, proportionnellement à la concentration incubée. C'est aussi le cas de l'aptamère 12.11, bien que les quantités retenues soient largement supérieures. Le résultat d'une expérience représentative est illustré par la figure 4.

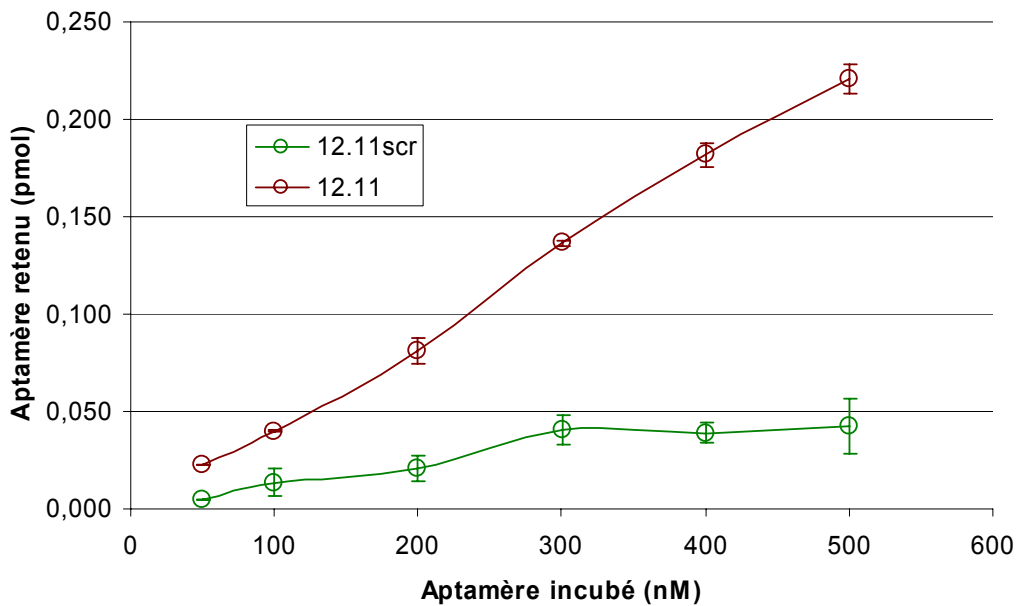


Figure 4. Quantification d'une expérience de liaison des aptamères 12.11 et 12.11scr aux cellules IP2-E4 (milieu RPMI, polyI 10 μ g/ml, incubation 20 min à 37°C).

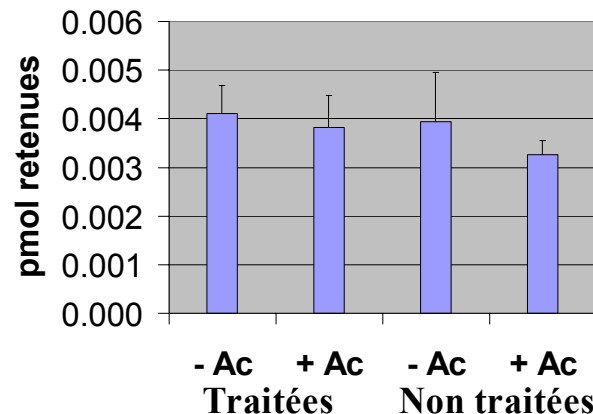
Examinons l'effet des paramètres indiqués plus haut.

- a. Les quantités retenues étaient plus élevées dans le DMEM (milieu de culture) que dans le RPMI (milieu de sélection), mais le ratio entre 12.11 et 12.11scr était à l'inverse plus grand dans le RPMI que dans le DMEM. L'expérience menée dans des tampons préparés avec des concentrations d'ions divalents (calcium, magnésium) ajustés à celles des milieux RPMI et DMEM a confirmé un effet critique de ces ions sur la liaison, sans totalement expliquer la forte rétention, probablement non spécifique, observée dans le DMEM.
- b. La température d'incubation s'est révélée sans influence notable, laissant supposer une absence d'accumulation intracellulaire des aptamères.
- c. Le support majoritairement utilisé a été le collagène, qui a efficacement renforcé l'adhésion cellulaire. Une expérience de contrôle menée sans cellules a montré une liaison non spécifique plus importante de 12.11 par rapport à 12.11scr sur collagène seul.
- d. L'efficacité des lavages a été contrôlée : 3 au minimum sont nécessaires, et au-delà de 7, la rétention résiduelle n'est plus affectée par des lavages supplémentaires.
- e. Conformément à l'expérience du laboratoire, le polyinositol (polyI) à 10 μ g/ml s'est révélé être le compétiteur non spécifique le plus efficace. Des concentrations supérieures sont sans effet.
- f. La séquence « scramble » (1211scr) est théoriquement un meilleur contrôle que la banque d'origine, puisque de composition identique en bases nucléotidiques. Wang *et al.* (2007) estiment notamment que le signal non-spécifique est influencé par la composition en guanine, qui est importante dans notre cas (5).

- g. La linéarité des courbes obtenues a été observée quelque soit la gamme de concentration utilisée.
- h. Le traitement au TNF- α est sans effet notable sur la liaison des aptamères, bien que les quantités retenues de 12.11 comme de 12.11scr tendent à être légèrement plus élevées après traitement.
- i. L'étape de pré-lavage ne modifie pas les courbes de liaison.

Si l'aptamère sélectionné est mieux retenu que l'aptamère contrôle (fig. 4) sur les cellules exprimant VCAM-1, les résultats soulèvent d'emblée la question de la spécificité de la liaison observée. L'absence d'effet du traitement au TNF- α est à ce titre un point critique. Les différentes conditions testées n'ayant pas permis de mettre en évidence une composante spécifique claire de la liaison de 12.11, il apparaît alors que la liaison de 12.11scr ne reflète pas correctement la liaison non spécifique de 12.11. Il faut alors envisager d'autres méthodes pour extraire du signal observé une composante spécifique putative. L'emploi d'anticorps bloquants pré-incubés avec les cellules en est une, qui s'est avéré sans effet notable sur la liaison de 12.11 (fig. 5).

Figure 5. Effet de l'anticorps bloquant MAVCM5 (Pierce) pré-incubé au 1/500^{ème} en présence de sérum sur la liaison de l'aptamère 12.11 (10 nM) aux cellules IP2-E4.



L'emploi du ligand lui-même, non radiomarqué et en excès, est classiquement utilisé, même si le coût des nucléotides fluorés en 2' limite la répétition de telles expériences. Un déplacement de l'aptamère radiomarqué est observé entre 100 nM et 1 μ M, suggérant une constante d'inhibition supérieure ou égale à 500 nM (fig. 6). Cette expérience suggère finalement la présence d'un site de faible affinité sur la surface cellulaire, mais nous n'avons pas d'argument indiquant qu'il s'agisse de VCAM-1.

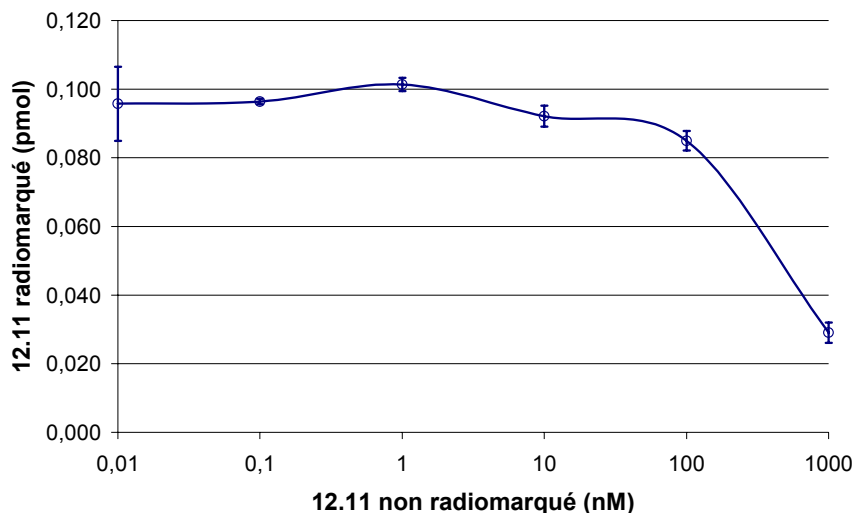


Figure 6. Déplacement de 12.11 radiomarqué (30 nM) par un excès de 12.11 non radiomarqué co-incubé sur les cellules IP2-E4.

1-2-2) Spécificité de l'aptamère 12.11

Il apparaît donc que l'aptamère sélectionné perd son affinité lors du passage du fragment purifié à la protéine native. Il s'agissait alors de savoir si une faible affinité envers la protéine VCAM-1 exprimée par les cellules IP2-E4 était conservée ou si la spécificité envers la cible était totalement perdue. Démontrer une spécificité supposée de l'aptamère 12.11 requierait une étape de purification de la cible cellulaire, qui a été réalisée par immunoprécipitation. La mise au point de cette technique a consisté à sélectionner l'anticorps approprié, les tampons de lyse cellulaire compatibles, et a conduit à mettre en place une étape de « pré-clearing » (incubation de l'extrait protéique avec les billes sépharose / protéine G) pour éliminer une protéine liée de manière non spécifique aux billes. Les résultats montrent une immunoprécipitation plus efficace par le côté C-terminal intra-cellulaire (anticorps polyclonal (chèvre) sc-1504 (Santa-Cruz)) que par la partie extracellulaire N-terminale (anticorps monoclonaux (rat, IgG₂) MAVCM5 (Pierce), MVCAM.A (Pharmingen)), ce dans 3 tampons de lyse plus ou moins dénaturants : RIPA sans SDS (noté RIPA), RIPA avec SDS 0,1% (noté RIPA^{SDS}), JS Buffer (contenant le détergent Triton X à 0,1%).

A l'échelle préparative, la coloration au bleu de Coomassie permet une estimation absolue de l'expression de VCAM-1 (à l'efficacité près de l'immunoprécipitation). Avec une sensibilité du gel de 0,1 µg ; MW(VCAM-1) = 100 kDa ; 10 mg d'extrait protéique par boîte de 175 cm² et une densité de 100 000 cellules/cm², on obtient une expression, probablement sous estimée, de 70 000 protéines par cellule. Cela correspond à environ 0,02 pmol par puit dans une expérience de liaison sur cellules, ce qui reste compatible avec le déplacement observé sur la figure 6.

Cette technique permet donc de précipiter une quantité de cible suffisante pour réaliser une expérience de liaison de l'aptamère radiomarqué sur le complexe billes sépharose / protéine G / anticorps / VCAM-1. La cible étant immunoprécipitée du côté C-terminal, le site de reconnaissance supposé de l'aptamère est accessible. Après l'immunoprécipitation, l'incubation avec les aptamères radiomarqués a lieu dans du RPMI en présence du compétiteur non spécifique ARNt. La radioactivité associée aux billes après lavages est comptée (fig. 7A) et les complexes sont dénaturés pour migration sur gel SDS-PAGE (fig. 7B) et confirmation de l'immunoprécipitation de la protéine attendue.

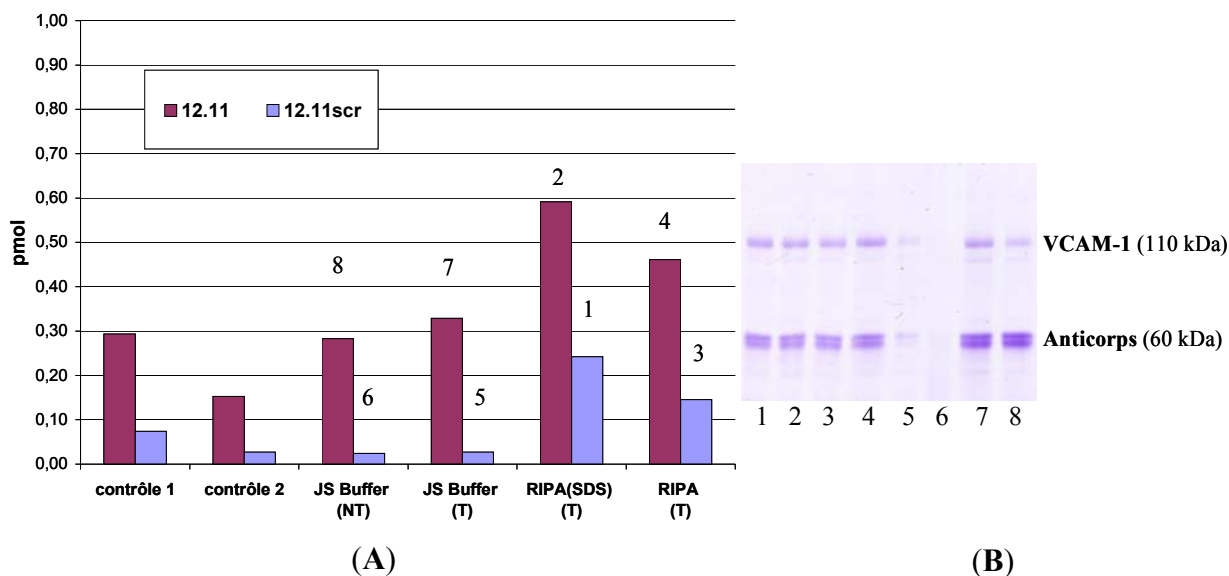


Figure 7. (A) Liaison des aptamères 12.11 et 12.11scr à VCAM-1 immunoprécipitée. La culture cellulaire est traitée au TNF- α (T) ou non (NT). JS Buffer, RIPA(SDS) et RIPA désignent les tampons d'immunoprécipitation. Les contrôles 1 (billes sépharose / protéine G) et 2 (billes sépharose / protéine G / anticorps) ont été incubés sans extrait cellulaire. (B) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les numéros de piste indiquent la correspondance avec les échantillons comptés.

Il apparaît premièrement que deux échantillons n'ont pas été immunoprécipités correctement (fig. 7B, pistes 5 et 6) ; deuxièmement que le traitement au TNF- α a un effet visible sur la quantité de cible immunoprécipitée (fig. 7B, pistes 7 et 8). Mais la rétention identique de 12.11 sur ces mêmes échantillons (fig. 7A, 7 et 8) montre clairement l'absence d'affinité de l'aptamère pour VCAM-1 dans ces conditions. Les résultats obtenus dans les autres tampons doivent tenir compte de la forte différence de liaison entre 12.11 et 12.11scr sur les échantillons contrôles, qui suggère un niveau élevé de liaison non-spécifique.

Une technique classique d'identification de cible est le pontage (*cross-link*), i.e. la création d'une liaison covalente entre deux molécules spécifiquement liées. Le rayonnement ultra-violet est particulièrement adapté à la réactivité des bases oligonucléotidiques des ARN simple-brins (6, 7) et la technique a déjà été employée avec des aptamères (8). Un protocole de cross-link aux UV sur culture cellulaire (4), employant l'aptamère radiomarqué, n'a révélé aucune spécificité réactionnelle, identifiable par une bande radioactive discrète sur gel SDS-PAGE. Afin d'éliminer une éventuelle composante non-spécifique masquant le signal, l'extrait cellulaire issu du cross-link a subi une immunoprécipitation : aucune radioactivité n'a alors été détectée.

Ces résultats issus de l'immunoprécipitation de VCAM-1 semble donc infirmer l'hypothèse d'une liaison de faible affinité de l'aptamère 12.11 à cette protéine. L'aptamère n'a donc plus aucune spécificité de liaison envers VCAM-1 sous sa forme native. Finalement, l'apparition sur le marché de protéines de fusion associant la partie extracellulaire de la forme humaine et murine de VCAM-1 au fragment constant d'un IgG humain (hVCAM/Fc et mVCAM-1/Fc) nous a permis de confirmer ce résultat, puisque les courbes de liaison obtenues par expérience de liaison sur filtre étaient linéaires et identiques pour les aptamères 12.11 et 12.11scr, bien inférieures à celles observées avec VCAM-1,2d (fig. 8).

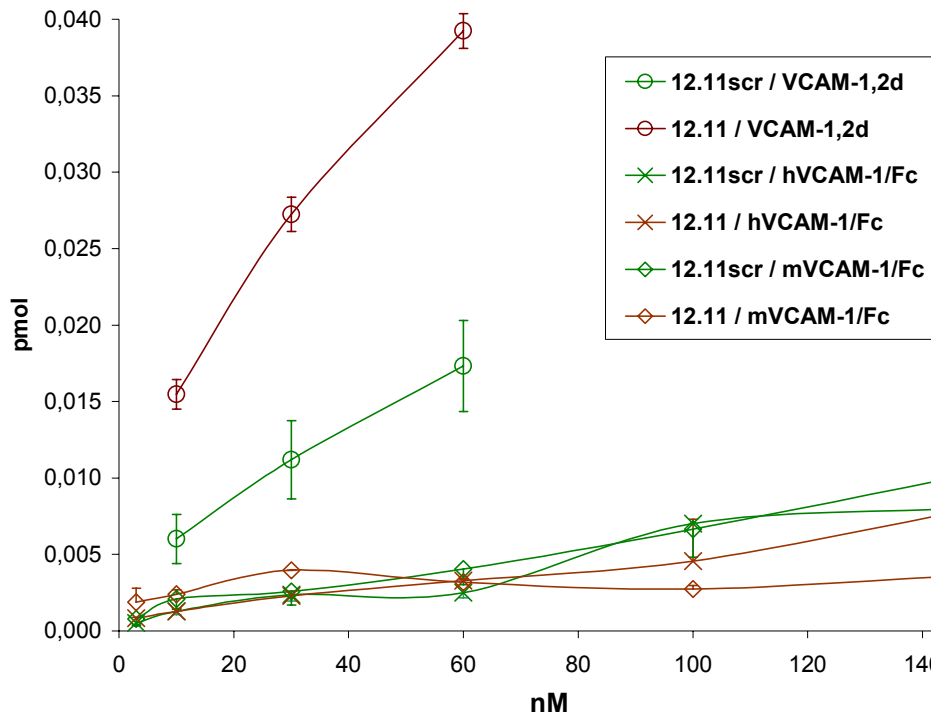


Figure 8. Courbes de liaison des aptamères 12.11 et 12.11scr aux protéines recombinantes VCAM-1,2d, hVCAM-1/Fc et mVCAM-1/Fc.

En conclusion, l'aptamère 12.11 sélectionné *in vitro* contre un fragment recombinant de VCAM-1, et se liant à celui-ci avec une excellente affinité, ne présente aucune affinité et spécificité envers la forme native de la protéine, exprimée à la surface cellulaire.

1-2-3) Sélection combinée sur cellules et protéine (« cross-over SELEX »)

Une interprétation de ce changement frappant entre les situations *in vitro* (fragment protéique recombinant) et *in vivo* (expression cellulaire) consiste à considérer que le processus de sélection a été trop efficace (!) en ce qu'il génère des aptamères uniquement spécifiques de la forme protéique utilisée lors de la sélection. Cela conduit à remettre en cause l'utilité d'une sélection menée uniquement sur protéine purifiée, et prône la conduite d'une sélection directement sur cellules.

Notre laboratoire a déjà expérimenté avec succès le concept de sélection combinée sur protéine et sur cellules ou *cross-over SELEX* (9), initialement décrit par Hicke *et al.* (10), permettant d'orienter la sélection sur cellules vers la cible visée, grâce à sa forme purifiée. Nous avons donc décidé de reprendre la sélection selon 2 stratégies, explicitées en figure 9.

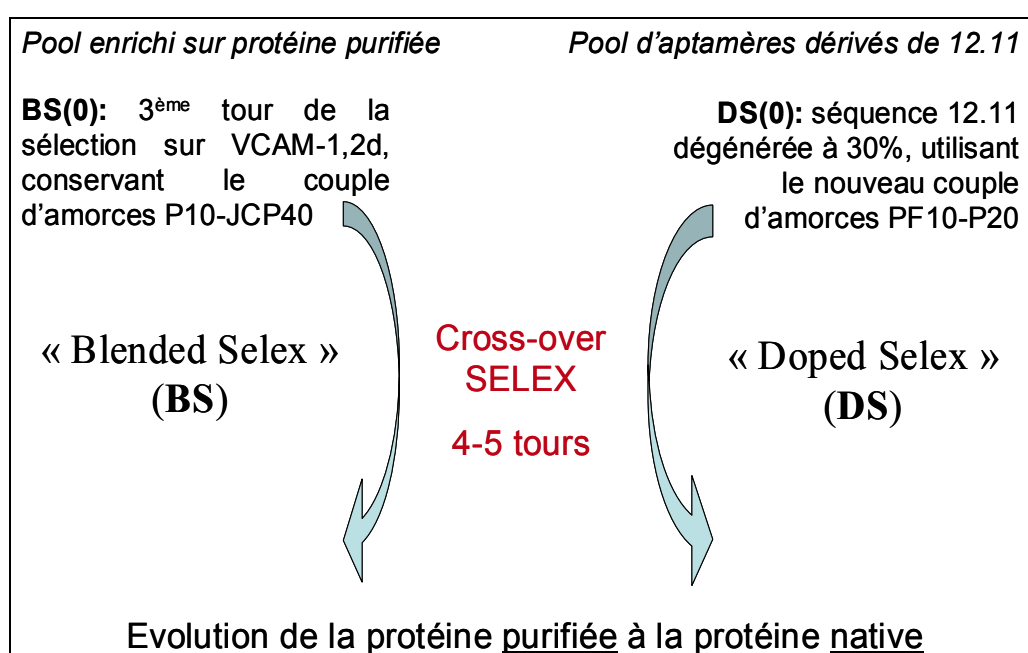


Figure 9. Stratégies de sélection dirigée contre la cible native, menées en parallèle.

La première stratégie, appelée ici « Blended Selex », consiste à conserver l'évolution primaire de la banque initiale au contact du fragment VCAM-1,2d purifié, et à démarrer une sélection sur cellules, au contact de la forme native de VCAM-1, avec une banque ayant faiblement évolué : la banque issue du troisième tour de sélection sur fragment a été retenue, parce qu'elle correspond au tour précédant l'apparition d'un profil spécifique en RFLP (Fig. 3A de l'article 1). Cette banque de départ BS(0) pour cette nouvelle sélection constitue donc une population encore très diversifiée.

La deuxième stratégie, appelée « Doped Selex », consiste à générer une nouvelle banque d'oligonucléotides en introduisant de manière contrôlée des mutations dans la séquence de l'aptamère 12.11. Une dégénérescence ou fréquence de mutation de 30%, c'est-à-dire l'introduction lors de la synthèse d'un mélange réactif contenant à 70% la base de la séquence 12.11, et à 10% chacune des trois autres bases, est considérée comme optimale, puisqu'elle permet d'obtenir une banque DS(0) dont la majorité des séquences possède 9 à 15 mutations (fig. 10), et dont toutes les séquences possibles avec 7 mutations au plus sont présentes en au moins un exemplaire (fig. 11). Schématiquement, c'est la fréquence de mutation qui permet d'obtenir toutes les séquences possibles avec le plus grand nombre de

mutations par séquence, selon des calculs menés sur la base de 10^{12} séquences mises en jeu au cours d'un tour de sélection (11).

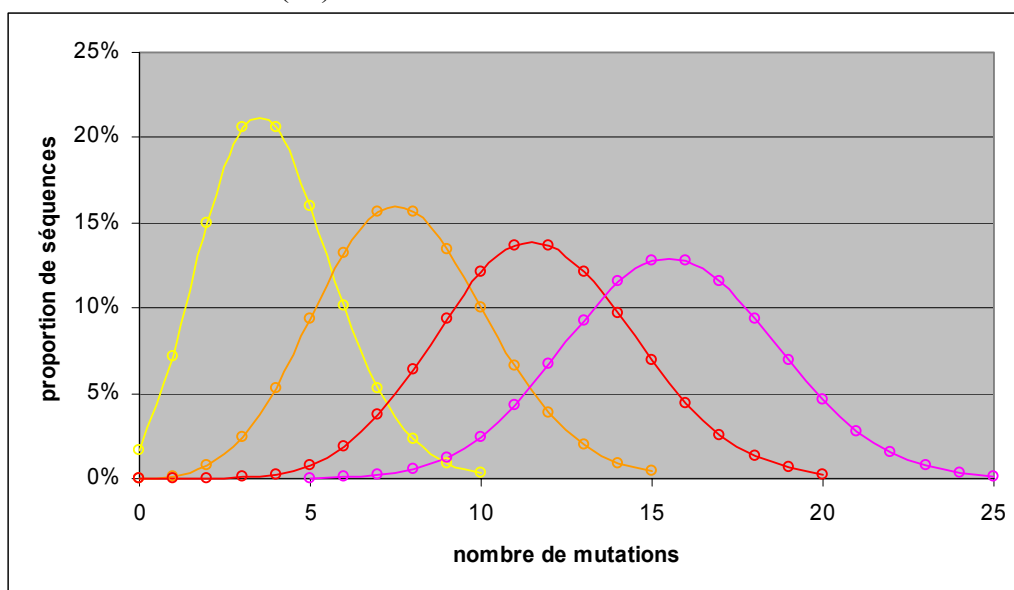


Figure 10. Répartition des séquences avec n mutations en fonction de la fréquence de mutation —○— 0,1 —○— 0,2 —○— 0,3 —○— 0,4

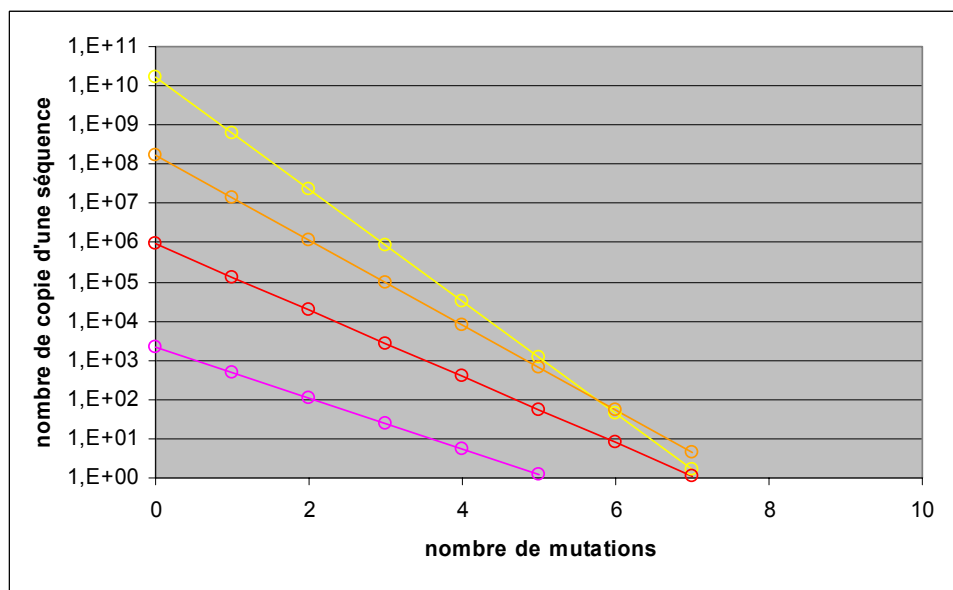


Figure 11. Nombre d'exemplaires d'une séquence donnée avec n mutations en fonction de la fréquence de mutation —○— 0,1 —○— 0,2 —○— 0,3 —○— 0,4
L'ordonnée à l'origine de chaque droite (aucune mutation) correspond au nombre de copie de l'aptamère 12.11.

La volonté de mener ces deux courtes sélections en parallèles a conduit à employer deux couples d'amorces différents afin de prévenir d'éventuelles contaminations d'une banque par l'autre : BS(0) conserve le couple d'amorces initial puisque cette banque est déjà issue d'une sélection, alors que DS(0) est synthétisée chimiquement sous forme d'ADN avec un nouveau couple d'amorces. L'aptamère 12.11, synthétisé avec ce nouveau couple, présente toujours une fixation supérieure à VCAM-1,2d par rapport au contrôle 12.11scr, mais

inférieure à l'aptamère 12.11 initialement sélectionné. Les banques de départ BS(0) et DS(0) ont été clonées et séquencées.

DS(0) → Echantillon de 15 séquences analysées

La taille moyenne des séquences est respectée : 39 ± 1 bases. Chacune contient 10 ± 3 mutations par rapport à la séquence de 12.11, ce qui est proche des 11.5 ± 3.5 attendus. Par contre, l'équiprobabilité des bases mutées n'est pas respectée puisque A, T, G, C apparaissent respectivement dans 21%, 21%, 43% et 12% des cas (pourcentages pondérés par la fréquence de chacune dans la séquence 12.11). L'apparition de G a été favorisée, celle de C défavorisée.

BS(0) → Echantillon de 17 séquences analysées

La taille moyenne des séquences est de 39 ± 1 bases. Il n'y a pas d'homologie au sein de cet échantillon, ni au niveau des séquences entre elles, ni vis-à-vis de la séquence 12.11.

Le déroulement général de la sélection a inclus 3 tours de sélection sur cellules, puis 1 tour sur le fragment recombinant purifié, afin d'orienter la sélection vers la protéine ciblée, suivi d'un dernier tour sur cellules. La sélection est réalisée au contact du tapis cellulaire d'une flasque moyenne (75 cm^2) de cellules activées par le TNF- α . L'incubation des aptamères emploie 2 ml de milieu RPMI 1640 tamponné à l'HEPES, identique à celui de la sélection initiale sur protéine purifiée, du polyI comme compétiteur non spécifique, avec une stringence graduelle dans le cas de BS, et une stringence forte dès le départ dans le cas de DS, puisque 12.11 a une fixation non nulle dans ces conditions. Aux tours 2 et 3, les conditions de sélection sont maintenues constantes pour favoriser l'émergence d'une population spécifique.

Le 4^{ème} tour, sur protéine purifiée, joue le rôle d'une contre-sélection par l'élimination des aptamères dirigés contre une autre cible que VCAM-1 (ou une autre région que les domaines 1 et 2 de VCAM-1). Les conditions de ce tour sont adaptées de celles des expériences de liaison sur filtre de 12.11 en diminuant la stringence par les lavages et l'aspiration.

Enfin, le 5^{ème} tour est destiné à introduire une compétition entre les aptamères anti-VCAM-1. Le tableau ci-dessous résume l'évolution des conditions de sélection et les quantités d'aptamères recueillis.

| | DS | BS |
|----------------------|---|---|
| Tour 1 (cellules) | [aptamères] = 250 nM soit $\approx 15 \mu\text{g}$ polyI : 200 μg 25 minutes à 37°C 1.4 pmol retenues soit 0.3 % | [aptamères] = 800 nM soit $\approx 48 \mu\text{g}$ pas de polyI 30 minutes à 37°C 6.1 pmol retenues soit 0.4 % |
| Tour 2 (cellules) | [aptamères] = 500 nM soit $\approx 30 \mu\text{g}$ polyI : 200 μg 20 minutes à 37°C 0.5 pmol retenues soit 0.05 % | [aptamères] = 650 nM soit $\approx 39 \mu\text{g}$ polyI : 100 μg 25 minutes à 37°C 0.1 pmol retenues soit 0.01 % |
| Tour 3 (cellules) | [aptamères] = 500 nM soit $\approx 30 \mu\text{g}$ polyI : 200 μg 20 minutes à 37°C 2.5 pmol retenues soit 0.25 % | [aptamères] = 650 nM soit $\approx 39 \mu\text{g}$ polyI : 100 μg 20 minutes à 37°C 1.3 pmol retenues soit 0.1 % |

| | | |
|----------------------|---|---|
| Tour 4 (protéine) | [aptamères] = 80 nM soit $\approx 3 \mu\text{g}$ ADNss : 100 μg [VCAM-1,2d] $\approx 500 \text{ nM}$ 30 minutes à 37°C 2 lavages, aspiration douce 1 pmol retenues soit 1 % | [aptamères] = 80 nM soit $\approx 3 \mu\text{g}$ ADNss : 100 μg [VCAM-1,2d] $\approx 500 \text{ nM}$ 30 minutes à 37°C 2 lavages, aspiration douce 0.5 pmol retenues soit 0.5 % |
| Tour 5 (cellules) | [aptamères] = 800 nM soit $\approx 48 \mu\text{g}$ polyI : 200 μg 15 minutes à 37°C 3.8 pmol retenues soit 0.2 % | [aptamères] = 800 nM soit $\approx 48 \mu\text{g}$ polyI : 100 μg 15 minutes à 37°C 4.2 pmol retenues soit 0.3 % |

NB : - suite à une erreur lors de l'amplification de l'ARN issu de DS3 (grisé), le tour 4, sur protéine, a donc directement fait suite au tour 2 ;
- les quantités mises en jeu lors des premiers tours ont été imposés par les rendements de transcription obtenus, plutôt faibles.

L'augmentation des quantités retenues (en pmol) au fil des tours est en cohérence avec le processus de sélection. Si la diminution entre BS(1) et BS(2) – 6,1 à 0,1 pmol – s'explique par l'introduction au 2^{ème} tour du polyI, la diminution entre DS(1) et DS(2) – 1,4 à 0,5 pmol – était inattendue : d'après les témoins d'amplifications PCR et les gels d'agarose correspondants, il s'agirait d'une contamination par un dimère d'amorce, qui a été éliminée par la suite. Globalement, une sélection efficace semble avoir eu lieu. Les populations finales BS(5) et DS(5) ont été clonées et séquencées. L'alignement des séquences et le degré d'homologie ont été étudié avec les logiciels Clustal X et DNASIS. La prédiction des structures est réalisée avec le logiciel MFOLD.

DS5 → Echantillon de 45 séquences analysées

De manière surprenante, la taille moyenne des séquences a fortement diminuée : 34 ± 3 bases, selon la répartition suivante indiquée Fig. 12. On distingue 2 groupes, ce qui peut expliquer l'observation de 2 bandes sur les gels d'agarose témoins de l'amplification.

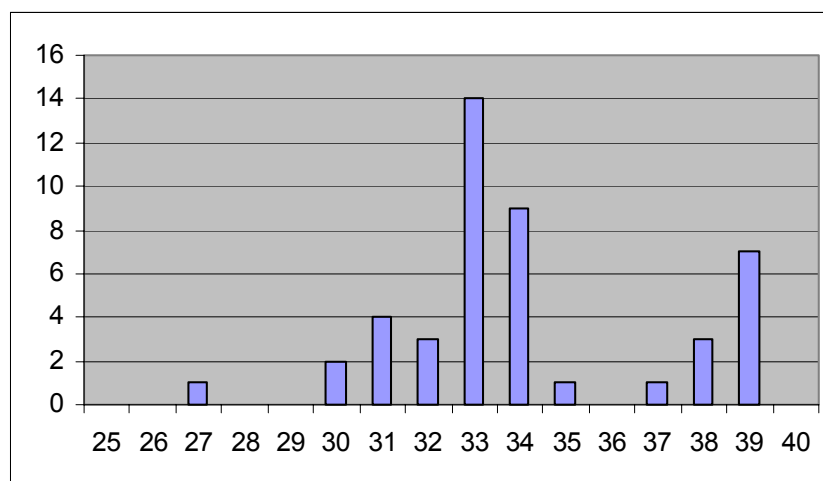
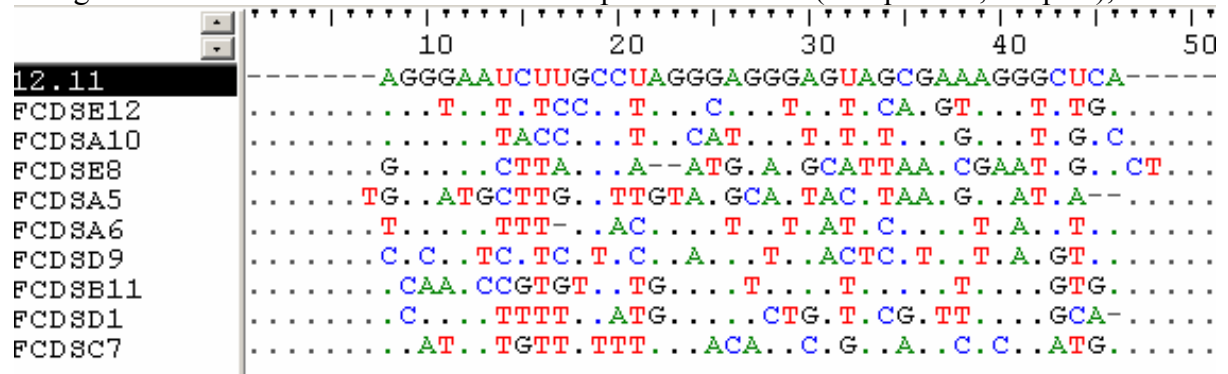


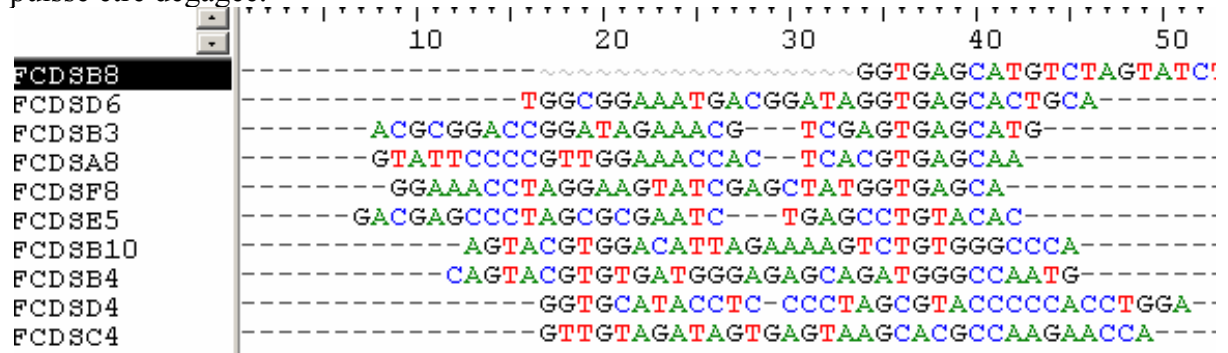
Figure 12. Histogramme de la répartition des aptamères séquencés issus de DS5 en fonction de leur taille en nombre de base.

Aucune séquence n'est présente à plus d'un exemplaire, et la séquence 12.11, théoriquement majoritaire dans la banque de départ (Fig. 11), a disparu. De plus, le degré d'homologie est faible. La population est donc restée fortement hétérogène. Néanmoins, sur la

base d'une homologie à 60% sur environ 25 bases (paramètres DNASIS), on peut faire émerger deux « familles » : l'une restée assez proche de 12.11 (9 séquences, ci-après),

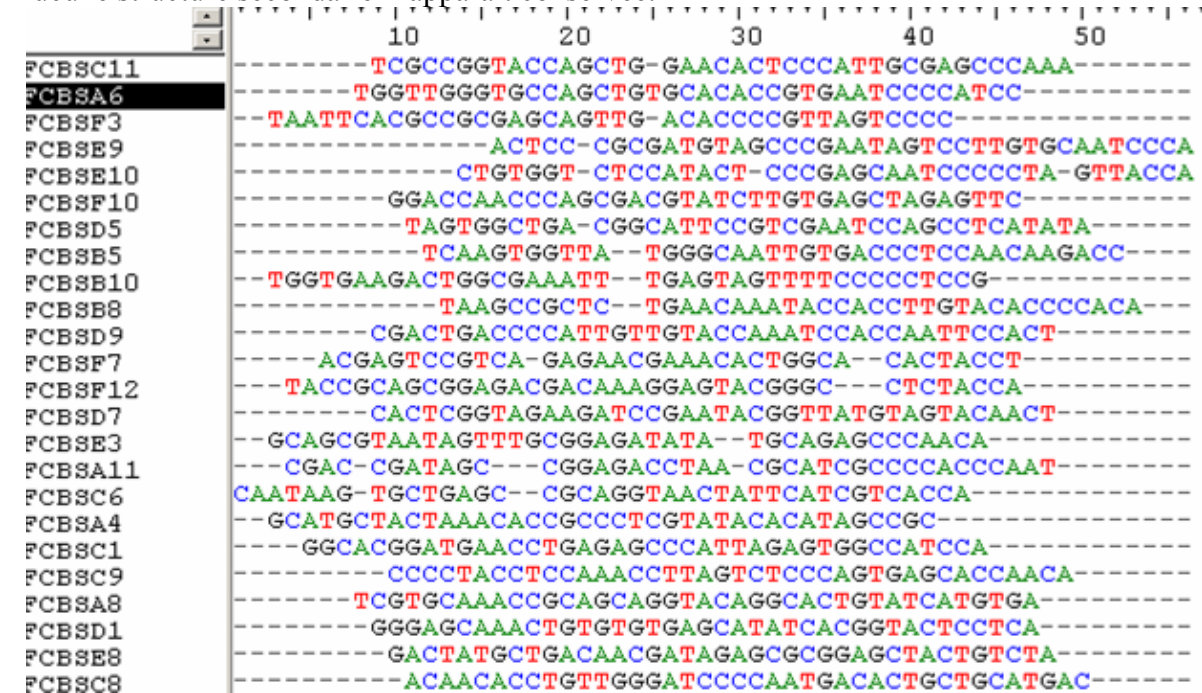


et l'autre dont les membres (une dizaine de séquences, ci-dessous) présentent entre elles des portions de séquences fortement homologues, sans toutefois qu'une séquence consensus puisse être dégagée.



BS5 → Echantillon de 24 séquences analysées

La taille moyenne n'a pas évoluée : 39 ± 1 bases. Un très faible degré d'homologie est observé entre les séquences (ci-dessous), qui sont toutes présentes en un seul exemplaire. Aucune structure secondaire n'apparaît conservée.



La liaison des populations BS(5) et DS(5) aux cellules (Fig. 13) révèle des courbes d'allure linéaire, avec des niveaux de fixation bien inférieures à celui de l'aptamère 12.11 initialement testé, et ce dès les premiers points (10 et 20 nM). La population la plus sensible au traitement par le TNF- α est BS(5).

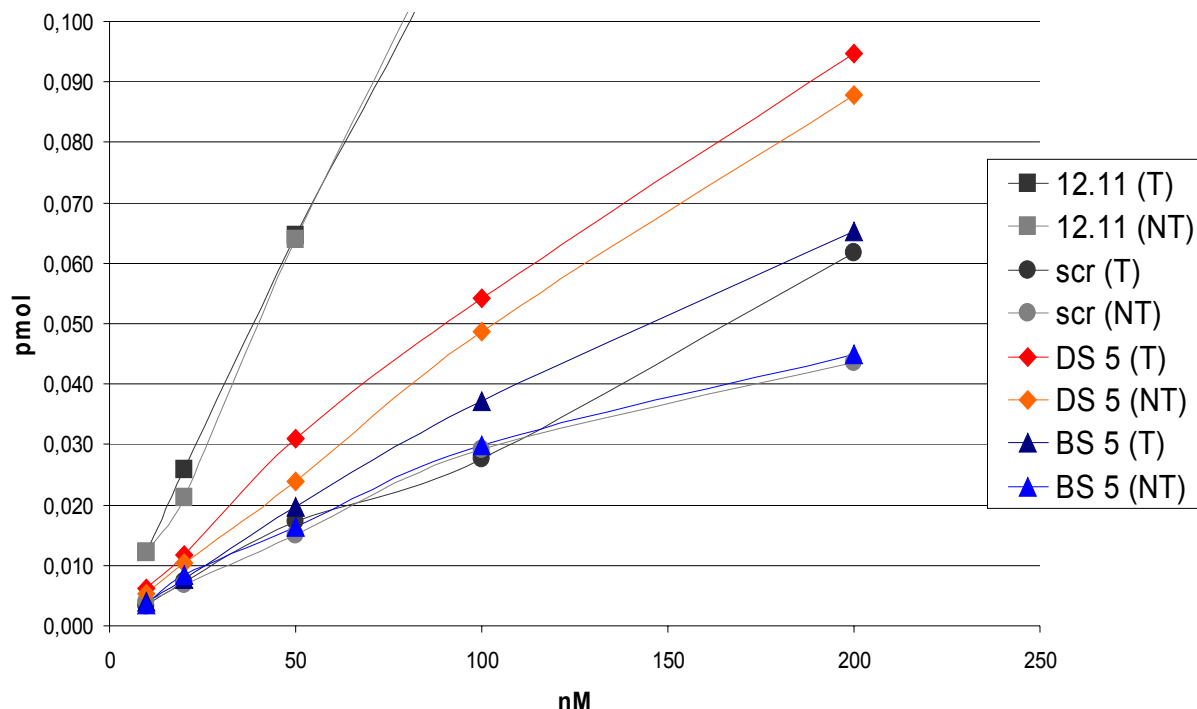


Figure 13. Liaison des aptamères 12.11 et 12.11scr, des populations DS(5) et BS(5) aux cellules traitées (T) ou non (NT) par le TNF- α . (Milieu RPMI, polyI à 10 μ g/ml).

Les 24 séquences issues de BS(5) ont donc été transcrites et purifiées en parallèle selon un protocole simplifié utilisant des filtrations sélectives par taille à la place de la traditionnelle purification sur gel d'acrylamide, assez longue (voir la partie expérimentale). La qualité de cette purification accélérée a été contrôlée, jugée acceptable (70-80%) pour une évaluation préliminaire de la liaison, et les séquences ont pu être testées individuellement selon une expérience de criblage utilisant 5 ou 10 μ g/ml de polyI afin d'estimer rapidement la spécificité de la rétention. Tous les aptamères ont montré une fixation sur cellules inférieure à celle de 12.11scr (Fig. 14). Cette expérience montre l'homogénéité de la population vis-à-vis de sa liaison aux cellules, dont aucun aptamère ne s'avère capable de discriminer clairement les cellules traitées des cellules non traitées. Quelques-uns (D1, F10, F12) ont été à nouveau transcrits et purifiés sur gel d'acrylamide. L'obtention des courbes de liaison complètes, d'allure linéaire, a confirmé ces conclusions.

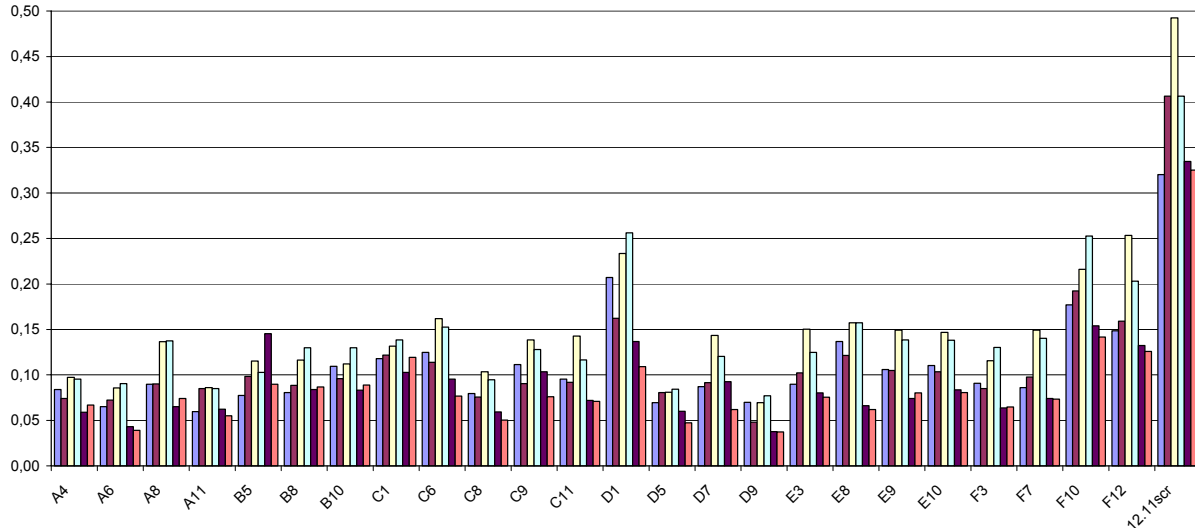
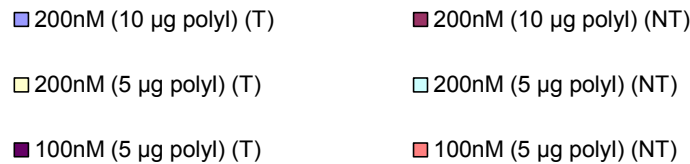


Figure 14. Criblage des aptamères issu de BS(5), comparés à 12.11scr (à droite) (nM, concentration de l'aptamère ; T : cellules traitées au TNF- α ; NT : cellules non traitées)



Devant cet échec, l'examen de la fixation des séquences individuelles issues de DS(5) n'a pas été réalisée. En effet, le profil de fixation observé sur la figure 14 est similaire à BS(5), et de plus, la modification importante de la taille des séquences à la fin de cette sélection (fig. 12) suggère un biais d'amplification ou de transcription favorisant certaines séquences ou certains motifs au détriment d'une sélection reposant sur le seul critère de l'affinité.

La poursuite sur cellules de la sélection initiée sur protéine purifiée n'a pas permis de faire émerger une population homologue d'aptamères se liant efficacement aux cellules. A ce stade, l'obtention d'un aptamère anti-VCAM-1 requiererait le démarrage d'une nouvelle sélection sur un autre système que le fragment et la lignée employés (discussion ci-après).

2) Discussion sur la sélection d'un aptamère anti-VCAM-1

Malgré des résultats qui apparaissaient initialement encourageants, la recherche d'un ligand du marqueur inflammatoire VCAM-1 est restée infructueuse, ce qui soulève naturellement de nombreuses questions. Ces questions peuvent être rassemblées en deux points essentiels, selon qu'elles concernent des aspects strictement méthodologiques du travail mené, ou des considérations sur le choix de la cible.

Aspects méthodologiques

Globalement, l'ensemble de ce travail, depuis la sélection originelle *in vitro* jusqu'aux sélections combinées sur cellules et protéine purifiée, constitue un exemple fort des limitations que représentent l'emploi de protéines recombinantes dans la recherche d'un nouveau ligand. Ceci est particulièrement sensible dans le cas de la sélection d'aptamères, puisque le SELEX, comme toute méthode combinatoire, offre peu de visibilité sur le processus de sélection en cours. C'est pourquoi un soin tout particulier est apporté à la définition *a priori* du système de sélection et des conditions de celle-ci. Ce n'est pas par hasard que les développements récents de sélection d'aptamères par SELEX, ou de peptides par *phage display*, concernent notamment la possibilité de réaliser le processus de sélection *in vivo* (sur cellules (12), et même directement chez l'animal (13, 14)). L'avantage est double : reconnaître la cible dans son environnement et sa conformation « naturels », et ajouter au critère de l'affinité, celui de la capacité à rejoindre le compartiment (au sens de la biodistribution) où est présente la cible. Très clairement, le transfert de notre travail de la protéine aux cellules s'est heurté à ses deux écueils.

Il est rétrospectivement évident que la spécificité de reconnaissance de l'aptamère 12.11 *in vitro*, vis-à-vis du fragment VCAM-1,2d, n'a pas été assez documentée. Le fait que les quantités retenues sur filtre soient particulièrement faibles au regard de la quantité de cible mise en jeu (<1%) laisse la porte ouverte à de nombreuses d'hypothèses : liaison à une conformation « exotique », faiblement représentée, de VCAM-1,2d, site de reconnaissance utilisant certains acides aminés du *Strep*-tag ou du peptide signal ompA (une faible proportion de ompA-VCAM-1,2d, visible sur gel coloré à l'argent, subsiste en solution), voire même, liaison à une impureté résiduelle ! Cependant, la méthode sur filtre peut aussi être la source d'un tel artefact : dénaturation au contact de la nitrocellulose, taille des pores, traitement alcalin. Il faut également ajouter que si un test d'adhésion n'a pas été validé selon un protocole bien établi, des expériences préliminaires menées avec des lymphocytes isolés de la rate de souris suggèrent que l'activité de VCAM-1,2d est très faible. Le respect de la conformation native par le système de production bactérien est donc en doute. Cependant plutôt que de multiplier les expériences *in vitro*, nous avons choisi, ces réserves étant émises, de franchir un pas de plus et de travailler sur cellules.

Les expériences de liaison sur cultures cellulaires ont fourni des résultats ambigus : si l'aptamère 12.11 est retenu en plus grande quantité que les contrôles, l'allure linéaire de la courbe de liaison ne permet pas de mettre en évidence un site de liaison spécifique, malgré la variété des conditions expérimentales testées. Cependant, la nature oligonucléotidique du ligand, sa taille intermédiaire entre une petite molécule organique et un anticorps, peuvent engendrer une dynamique de liaison particulière, qui n'est ni celle d'une petite molécule organique, ni celle d'un anticorps. Ceci explique la particularité du protocole, qui reste proche

d'une expérience de liaison menée avec une petite molécule (gamme de concentration, lavages rapides), mais emploie un compétiteur non-spécifique destiné à saturer les sites de faible affinité de la surface cellulaire (il s'agit typiquement pour un oligonucléotide des protéines chargées positivement). On peut envisager à l'inverse d'appliquer aux aptamères les méthodes de détection des anticorps (biotinilation, forte dilution du ligand, et large excès de compétiteur non spécifique), afin d'observer un site de marquage spécifique. Ceci nécessite un lourd travail de mise au point qui n'a débuté que récemment au laboratoire. L'analyse de la littérature montre qu'il n'y a pas de protocole standard établi pour caractériser la liaison d'un aptamère à sa cible (utilisation, outre les techniques de liaison sur filtre et sur cellules, décrites ici, de la technique Biacore (15), de l'électrophorèse (16), de la fluorescence quantifiée par FACS (17), ou FRET (18)). Les caractéristiques pharmacocinétiques de liaison des oligonucléotides restent donc encore largement à définir.

L'échec de la reconnaissance par l'aptamère 12.11 de la cible immunoprécipitée, et des protéines recombinantes commerciales nous a finalement convaincu de la perte de spécificité envers la protéine native. Dès lors, la poursuite du projet passait, sinon par une nouvelle sélection qui n'était pas vraiment envisageable pour des raisons de temps, du moins par la poursuite de la sélection entreprise sur cellules. Ce faisant, l'hypothèse était faite que 12.11 (Doped SELEX) ou des aptamères éliminés dans les derniers tours de la sélection *in vitro* (Blended SELEX) se liaient à VCAM-1,2d sous une conformation proche de la conformation native, et qu'une sélection courte permettrait l'évolution entre la reconnaissance de ces deux conformations. Dans les deux cas, l'absence d'homologie entre les séquences obtenues par clonage à l'issue des sélections suggère, soit que l'hypothèse de départ était fautive, soit que le support cellulaire de sélection (protéique et/ou cellulaire) était inadapté.

La possibilité que le système d'expression et de purification de VCAM-1,2d puisse introduire une variabilité dans la conformation protéique a été évoquée plus haut. Le choix du système cellulaire est également crucial, notamment via le nombre de cibles disponibles à la surface cellulaire, et via la possibilité de mener une contre-sélection sur le même type cellulaire n'exprimant pas la cible. A ce double titre, l'emploi pour la sélection d'une lignée transfectée de manière stable avec le gène VCAM-1 sous la dépendance d'un promoteur fort, et de la même lignée non transfectée pour la contre-sélection, aurait offert plus de garantie que le système d'expression endogène utilisé. Le grand nombre de cibles présentes en abondance à la surface cellulaire n'a probablement pas permis de diriger rapidement la sélection vers une cible moins abondante. Fort de cette expérience « malheureuse », et d'autres plus « heureuses » (19), le laboratoire a publié récemment une analyse comparée des stratégies de sélection combinant cellules et protéines purifiées, qui appuie ces recommandations (9).

Choix de la cible

Au plan physiopathologique, VCAM-1 est une cible extrêmement attractive puisque sa détection permettrait de visualiser l'activation de l'endothélium, indépendamment de l'intégrité de la BHE. Une telle technique constituerait un complément intéressant de l'imagerie de l'activation microgliale dans le cas de multiples neuropathologies, inflammatoires ou neurodégénératives. D'autres applications potentielles majeures incluent la détection de la plaque athéromateuse et l'évaluation des thérapies anti-inflammatoires ou anti-adhésives au niveau central et périphérique. Les avantages d'un ligand de nature oligonucléotidique par rapport aux ligands peptidiques publiés (20) concernent, comme

évoqué précédemment (partie A-4-4), la minimisation du risque immunogénique et la variété des modifications chimiques déjà décrites permettant de moduler la biodistribution des aptamères.

Mais une méthode de sélection combinatoire ne garantit pas des résultats universels, et si les oligonucléotides montrent une richesse structurale impressionnante qui permet aux aptamères de rivaliser avec les anticorps, les spécialistes du SELEX s'accordent à dire qu'il existe des cibles étonnamment « résistantes » à la liaison aux oligonucléotides. De ce point de vue, la protéine VCAM-1 possède deux caractéristiques qui ont certainement leur importance quant à la recherche d'un site de liaison. Premièrement, en tant que membre de la super-famille des immunoglobulines, VCAM-1 est structurée en domaines compacts formés de deux feuillets β anti-parallèles qui offrent peu de résidus exposés susceptibles d'entrer en interaction avec une autre molécule. L'interaction du ligand endogène de VCAM-1, l'intégrine VLA-4, utilise précisément la boucle la plus proéminente et exposée du domaine 1, où se trouve le motif crucial de 4 à 5 acides aminés IDSP(L) [Ile-Asp-Ser-Pro(-Leu)] (21, 22), chargé négativement. D'où le deuxième point, qui constitue la charge globale négative des deux domaines N-terminaux de la protéine ($pI = 5,0$; calculé avec le programme Compute pI/Mw : http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), et notamment le potentiel électrostatique de surface fortement négatif sur la face en interaction avec VLA-4 (Fig. 15), l'autre face étant décrite comme « relativement neutre » (23). Ceci n'est évidemment pas favorable à la liaison à un oligonucléotide, lui aussi chargé négativement.

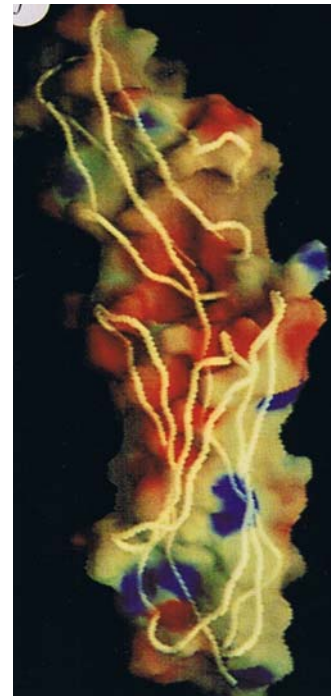


Figure 15. Potentiel de surface électrostatique de VCAM-1,2d, positif en bleu et négatif en rouge, extrait de Jones *et al.* (1995) (23).

Il est remarquable que préalablement à ce travail, plusieurs sélections aient été menées contre la protéine ICAM-1, à la fois au laboratoire, et par un partenaire industriel spécialisé (projet européen OLIM, <http://oligoimaging.free.fr/olim/>), sans plus de succès. Ces sélections utilisant des protéines recombinantes, commerciale ou de synthèse, et n'ont pas fourni d'aptamères liant efficacement la cible, structurée comme VCAM-1 en domaines immunoglobulines, et chargée négativement (domaines 1 et 2 : $pI = 4,9$). Par ailleurs, ICAM-1 et VCAM-1 possèdent un pont di-sulfure additionnel sur une partie exposée du domaine 1, correspondant à la partie hyper-variable d'un anticorps. Cette particularité « ferme » le domaine, et en accentue la compacité (24). Nous pensons donc que ces membres de la super-famille des immunoglobulines constitue des cibles délicates pour la liaison à un oligonucléotide.

Pourtant, plusieurs aptamères anti-immunoglobulines ont été décrits (IgE (16, 25), CD4 (15, 17), anticorps monoclonal (26), polyclonal (27)), et des aptamères agissent comme leurre (*decoy aptamers*) envers des autoanticorps produits lors de maladies autoimmunes (28, 29). L'un inhibe ($K_i \sim 150nM$) la liaison du peptide antigénique au niveau d'une charge

négligée de surface d'un anticorps IgG (18), mais cette interaction anticorps/antigène a lieu au sein d'une poche, qui autorise des interactions hydrophobes et la formation de liaisons hydrogènes dominant la répulsion électrostatique (Fig. 16). L'existence d'une telle poche, susceptible d'accueillir la présence d'un ligand, n'a pas été décrite pour VCAM-1.

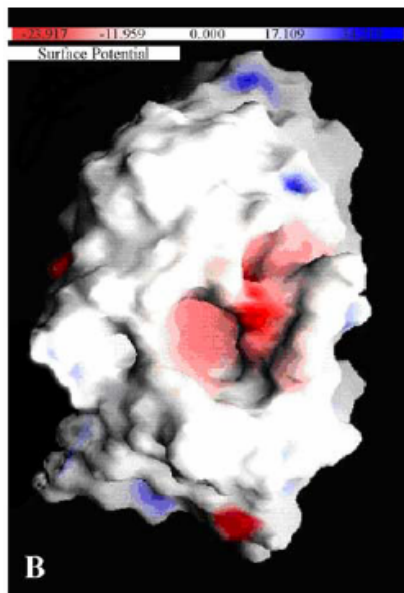


Figure 16. Modèle pour le potentiel de surface électrostatique de C595-Fv, positif en bleu et négatif en rouge, extrait de Missailidis *et al.* (2005) (18).

Il est à noter que ces aptamères anti-immunoglobulines ont tous été sélectionnés contre des cibles purifiées. Ainsi, l'abondance et la similarité des structures protéiques en domaines immunoglobulaires à la surface cellulaire peut aussi être une raison à l'échec de notre approche de sélection sur cellules.

Si la résolution de plusieurs structures a permis d'analyser les modes d'interaction entre un aptamère et une petite molécule (30), une analyse détaillée des « aptatopes » (15) à la surface de cibles protéique n'est pas disponible actuellement à cause de la difficulté évidente d'étudier de tels complexes. Il est supposé que la taille d'un aptamère lui permet d'établir plusieurs points de contact avec une surface protéique donnée, ce qui génère une remarquable spécificité, mais s'avère peut-être défavorable dans le cas des molécules d'adhésion appartenant à la super-famille des immunoglobulines, pour les raisons citées précédemment.

Une alternative intéressante à ces limitations repose sur l'emploi de bases modifiées. La modification des pyrimidines en 2'-fluoro utilisée ici est destinée à conférer une résistance accrue aux nucléases en vue d'une utilisation *in vivo* (30). D'autres modifications ont été décrites, dans le but de diversifier les fonctionnalités chimiques des acides nucléiques (31). La preuve de ce concept a été faite avec la sélection d'aptamères dont les bases thymidines modifiées portent des charges cationiques et permettent la reconnaissance d'un oligosaccharide chargé négativement (32). Mais dans ce cas, la cible reste une molécule relativement petite et flexible, et les aptamères obtenus ont une affinité modeste. Une méthode séduisante sur le plan théorique a été récemment décrite, alliant chimie et biologie combinatoire : la modification classique en 2'-amino des pyrimidines est utilisée pour introduire des réactions réversibles avec des aldéhydes présents en solution (33).

Ainsi, le concept de développement d'un « *escort aptamer* » (34) pour l'imagerie de la neuroinflammation n'a pas pu être porté jusqu'au stade de l'évaluation expérimentale. La cible d'intérêt retenue en fonction de critères liés à l'imagerie présente des caractéristiques structurales qui peuvent expliquer certaines difficultés rencontrées, au-delà des critiques méthodologiques qui peuvent être adressées à ce travail.

Bibliographie du chapitre B

1. O'Connell KA, et al. A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *J Immunol* 1990;144(2):521-5.
2. O'Connell KA, et al. Cloned spindle and epithelioid cells from murine Kaposi's sarcoma-like tumors are of endothelial origin. *J Invest Dermatol* 1993;100(6):742-5.
3. O'Connell K, et al. Endothelial cells transformed by SV40 T antigen cause Kaposi's sarcomalike tumors in nude mice. *Am J Pathol* 1991;139(4):743-9.
4. Pestourie C. Sélection d'aptamères par approche combinatoire : De nouveaux radioligands pour l'Imagerie Moléculaire in vivo (Thèse de doctorat): Université Paris 5; 2005.
5. Wang Y, et al. Nonspecific cellular accumulation of ^{99m}Tc-labeled oligonucleotides in culture is influenced by their guanine content. *Nucl Med Biol* 2007;34(1):47-54.
6. Zhang L, et al. Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(3):705-11.
7. Liu ZR, et al. Methylene blue-mediated cross-linking of proteins to double-stranded RNA. *Methods Enzymol* 2000;318:22-33.
8. Morris KN, et al. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2902-7.
9. Pestourie C, et al. Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target. *Oligonucleotides* 2006;16(4):323-35.
10. Hicke BJ, et al. Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* 2001;276(52):48644-54.
11. Knight R, et al. Analyzing partially randomized nucleic acid pools: straight dope on doping. *Nucleic Acids Res* 2003;31(6):e30.
12. Blank M, et al. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem* 2001;276(19):16464-8.
13. Pasqualini R, et al. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380(6572):364-6.
14. Kelly KA, et al. In vivo imaging of molecularly targeted phage. *Neoplasia* 2006;8(12):1011-8.
15. Kraus E, et al. Cutting edge: novel RNA ligands able to bind CD4 antigen and inhibit CD4+ T lymphocyte function. *J Immunol* 1998;160(11):5209-12.
16. Mendonsa SD, et al. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2004;76(18):5387-92.
17. Davis KA, et al. Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1998;26(17):3915-24.
18. Missailidis S, et al. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immunol Methods* 2005;296(1-2):45-62.
19. Cerchia L, et al. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol* 2005;3(4):e123.
20. Kelly KA, et al. In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Mol Imaging Biol* 2006;8(4):201-7.
21. Clements JM, et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 8):2127-35.
22. Newham P, et al. Alpha4 integrin binding interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. Integrin binding footprints identify accessory binding sites that play a role in integrin specificity. *J Biol Chem* 1997;272(31):19429-40.
23. Jones EY, et al. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature* 1995;373(6514):539-44.
24. Wang JH, et al. Structure of a functional fragment of VCAM-1 refined at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1996;52(Pt 2):369-79.

25. Wiegand TW, et al. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol* 1996;157(1):221-30.
26. Doudna JA, et al. Selection of an RNA molecule that mimics a major autoantigenic epitope of human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):2355-9.
27. Tsai DE, et al. In vitro selection of an RNA epitope immunologically cross-reactive with a peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(19):8864-8.
28. Lee SW, et al. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. *Nat Biotechnol* 1997;15(1):41-5.
29. Lee SW, et al. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(2):315-24.
30. Hermann T, et al. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000;287(5454):820-5.
31. Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 2000;74(1):27-38.
32. Masud MM, et al. Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. *Bioorg Med Chem* 2004;12(5):1111-20.
33. Bugaut A, et al. Use of dynamic combinatorial chemistry for the identification of covalently appended residues that stabilize oligonucleotide complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43(24):3144-7.
34. Hicke BJ, et al. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest* 2000;106(8):923-8.

C) RADIOLIGANDS DU RECEPTEUR PERIPHERIQUE AUX BENZODIAZEPINES

Le [¹¹C]-(*R*)-PK11195, en tant que seul radioligand du PBR utilisé en recherche clinique, est le traceur de référence. L'expérience acquise a permis de valider le concept d'imagerie de la neuroinflammation et laisse entrevoir une application pour de nombreuses situations physiopathologiques. Des limitations sont apparues, eu égard à la faible sensibilité de la molécule, et aux difficultés de quantification. Alors qu'un grand nombre de radioligands potentiels ont déjà été décrits, peu ont été testés sur des modèles précliniques pertinents. Ce chapitre décrit l'évaluation comparative au traceur de référence de plusieurs molécules alternatives, de même cible moléculaire, dans deux modèles de neuroinflammation, l'un aiguë (5 traceurs évalués) et l'autre chronique (1 traceur évalué).

Caractéristiques physicochimiques des radioligands évalués

Les formules chimiques des radioligands, et les données *in vitro* disponibles pour ces ligands (affinité, spécificité, log P, activité) sont rassemblées dans le tableau 1.

| RADIOTRACEUR | Formule chimique semi-développée | Radio-marquage | logD (logP) (shaking flask method) | logD (HPLC method) | Ki (nM) ([³ H]PK11195) | Ki (nM) ([³ H]Ro5-4864) | Ki (nM) ([³ H]Flumazenil) | Activity (pregnolone accumulation in C6 cells) |
|-----------------------------|----------------------------------|---|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| [¹¹ C]PK11195 | | N-methylation (¹¹ C _H ₂ l) | 2,8 ± 0,1 | 3,4 | 9,3 ± 0,5 | | > 10.000 | 28 ng/mg proteine/2h |
| [¹¹ C]DPA-713 | | O-methylation (¹¹ C _H ₂ Tf) | 2,4 ± 0,1 (2,4 ± 0,1) | 2,4 | 4,7 ± 0,4 | 3,1 ± 0,2 | > 10.000 | 17 ng/mg proteine/2h |
| [¹⁸ F]DPA-714 | | substitution nucléophile (K ¹⁸ F) | | 2,4 | 7,0 ± 0,2 | | > 10.000 | 56 ng/mg proteine/2h |
| [¹¹ C]DPA-715 | | O-methylation (¹¹ C _H ₂ l) | 2,7 ± 0,2 (2,6 ± 0,2) | 4,5 | 16,0 ± 1,0 | 3,4 ± 0,2 | 6260 ± 250 | 24 ng/mg proteine/2h |
| [¹¹ C]CLINME | | N-methylation (¹¹ C _H ₂ l) | 1,9 ± 0,1 | | 3,2 ± 0,3 | 5,2 ± 0,6 | 366 ± 23 | |
| [¹¹ C]SSR180575 | | N-methylation (¹¹ C _H ₂ Tf) | 1,9 ± 0,4 | | 3,5 | 2,5 ± 0,6 | 9,5 ± 1,5 (% inhibition à 1µM) | |

Tableau 1. Présentation des radiotraceurs utilisés et récapitulatif des données *in vitro*. Celles-ci sont issues de la littérature (références dans le texte ci-dessous) excepté les mesures de logD (logP) par la méthode d'agitation du mélange biphasique (**Bertrand Kühnast, SHFJ**).

Quatre classes chimiques sont représentées : PK11195 possède un noyau isoquiniline, DPA-713, -714, -715 sont des pyrazolopyrimidines, CLINME est une imidazopyridine, et SSR180575 est un pyridazino-indole.

Les caractéristiques des composés DPA ont été obtenus dans les mêmes conditions que celles du PK11195, et donc sont directement comparables (1, 2). Ce n'est pas le cas des molécules CLINME (A. Katsifis, données non publiées) et SSR180575 (3). L'activité du SSR180575 a par ailleurs été évalué dans différents protocoles cellulaires et modèles animaux (3, 4).

Tous sont plus polaires que le PK11195, excepté DPA-715, de lipophilicité égale ou supérieure suivant la méthode de mesure.

Les constantes d'inhibition reflètent des affinités de l'ordre de 1 à 10 nM (mesurée à $1,95 \pm 0,22$ nM dans le cas du SSR180575 (5)), ainsi qu'une similarité des sites de liaison avec ceux de PK11195 et Ro5-4864. La spécificité du site PBR vis-à-vis du site CBR est démontrée pour toutes ces molécules, avec un facteur 100 au minimum.

Le test d'activité employé par Selleri *et al.* (1) mesure l'accumulation de pregnolone dans des cellules, le métabolisme de celle-ci étant inhibé. Les résultats montrent un comportement agoniste pour DPA-714. Les autres composés DPA testés ne diffèrent pas significativement du PK11195, dont le comportement est généralement qualifié d'antagoniste ou d'agoniste partiel, sur la base de protocoles différents de celui-ci (6, 7).

1) Modèle de neuroinflammation aiguë

Historiquement, la démonstration de la validité de la liaison du PK11195 ou du Ro5-4864 au PBR comme index de la perte neuronale a été menée sur des modèles d'excitotoxicité (8-10). Ceux-ci sont simples à mettre en œuvre, reproductibles, et permettent donc une évaluation fiable de la réaction inflammatoire en une seule mesure. Parmi les excitotoxines couramment utilisées, l'acide (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolo-propionique (AMPA) est un neurotoxique plus puissant que l'acide *N*-méthyl-D-aspartique (NMDA), et reflète plus linéairement la perte neuronale que l'acide kainique (KA) (10), qui de plus a une activité épileptogène (11). De plus, il réalise une lésion plus homogène que l'acide quinolinic (QA), qui épargne certains neurones et est utilisé comme modèle de la maladie d'Huntington (12). Le lipopolysaccharide (LPS), fréquemment utilisé crée une lésion plus diffuse, avec une perte neuronale moindre (13, 14).

1-1) Caractérisation

Le modèle consiste en une injection intrastriatale de 7,5 nmol d'acide (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolo-propionique (AMPA) dans l'hémisphère droit de rats Wistar âgés de 4 à 6 semaines (250 à 350g). L'excitotoxicité est manifeste à 48h en histologie, et la taille de la lésion peut être mesurée précisément par un contraste net dans le tissu viable. La lésion est striatale chez tous les animaux, avec des extensions fréquentes dans le thalamus, et plus rares dans le cortex piriforme (Fig.1A-C). En combinant les résultats de l'étude histologique avec ceux de l'étude immunohistochimique et autoradiographique (ci-après), il apparaît que 50% des animaux ont une atteinte thalamique, et 20 à 30% des animaux selon les groupes considérés présentent une lésion du cortex piriforme. Ces extensions thalamique et corticale contribuent principalement à la variabilité du modèle en terme de taille totale de lésion ($44 \pm 26 \text{ mm}^3$, $n=7$) et de taille de l'oedème ($36 \pm 29\%$, $n=7$), alors que la taille de la lésion strictement striatale est plus homogène ($21 \pm 5 \text{ mm}^3$, $n=7$). La lésion corticale additionnelle provoquée par le passage de l'aiguille est en général négligeable.

A des temps plus tardifs, la lésion apparaît progressivement plus marquée par le Cresyl Violet, jusqu'à devenir quasiment indistincte du tissu non lésé après une semaine (Fig.1D), cette évolution signalant une infiltration microgliale/monocytaire entre 2 et 7 jours.

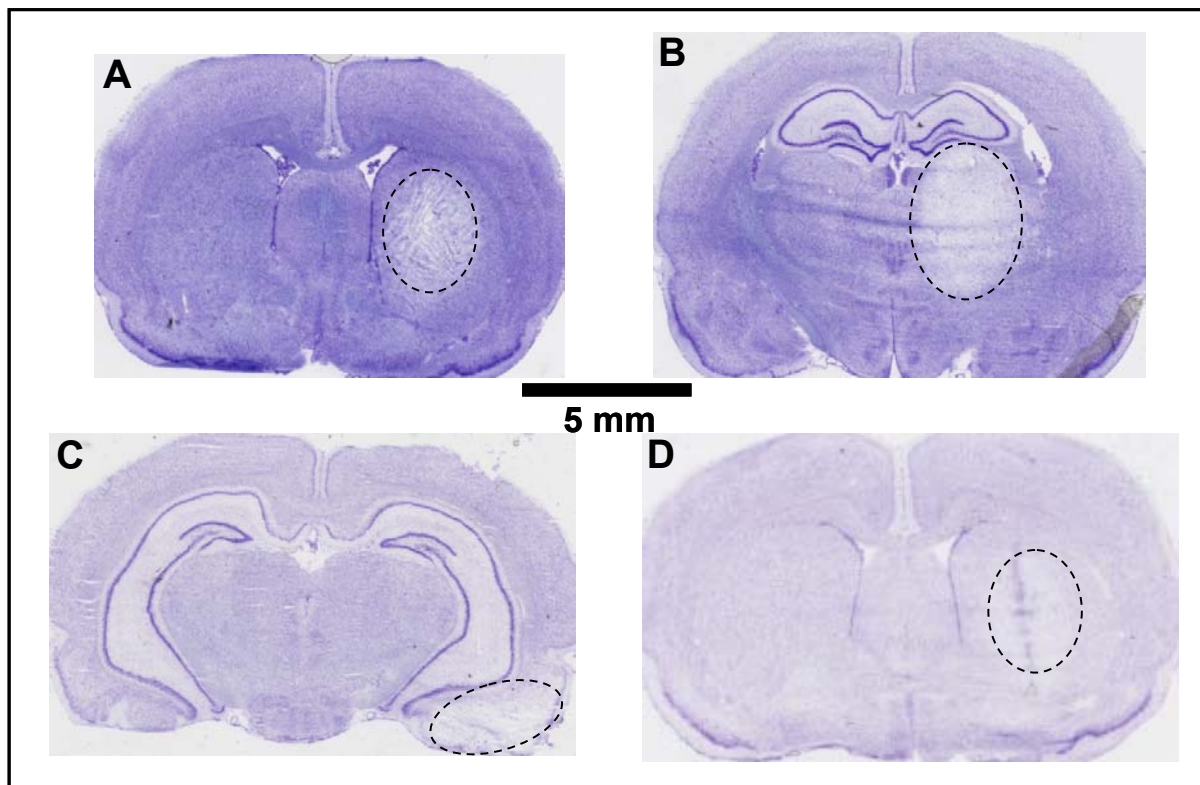


Figure 1. Localisation histologique (Cresyl violet) de la lésion créée par une injection intrastriatale d'AMPA ; lésion (A) striatale, (B) thalamique, (C) corticale (cortex piriforme) à 2 jours ; lésion striatale à 7 jours (D).

L'étude immunohistochimique a été menée en utilisant les marqueurs des neurones, astrocytes réactifs et macrophages/microglie activée, respectivement NeuN, GFAP, et Cd11b. Elle a confirmé la localisation striatale de la lésion, et ses extensions thalamique et corticale éventuelles. Un animal a été examiné 48h après l'injection : si la perte neuronale est avérée,

l'activation astrogliale reste faible, limitée au site de l'injection (Fig. 2A). Après 7 jours (n=10), la lésion apparaît très densément peuplée de cellules CD11b-positives, dont l'origine peut être résidente (microglie activée) ou circulante (monocytes/macrophages). Cet amas cellulaire d'allure compacte et désorganisée est entouré par une couronne d'astrocytes réactifs (Fig. 2B). Ceux-ci infiltrent légèrement le groupe de cellules CD11b-positives mais ils sont exclus du cœur de la lésion. A la forte réactivité gliale correspond très exactement une absence de marquage neuronal. Ceux-ci apparaissent également en plus faible quantité aux alentours de la lésion que dans la zone controlatérale correspondante (Fig. 2C). Le côté controlatéral est totalement dénué de marquage CD11b, et faiblement marqué par GFAP. Les tailles des lésions n'ont pas été quantifiées via le marquage immunohistochimique, mais étaient visuellement similaires à celles mesurées à 2 jours en histologie. Un animal a reçu une injection de tampon phosphate (PBS) sans AMPA : après 7 jours, la perte neuronale et l'activation astrogliale sont limitées à la zone de passage de l'aiguille (Fig. 2D).

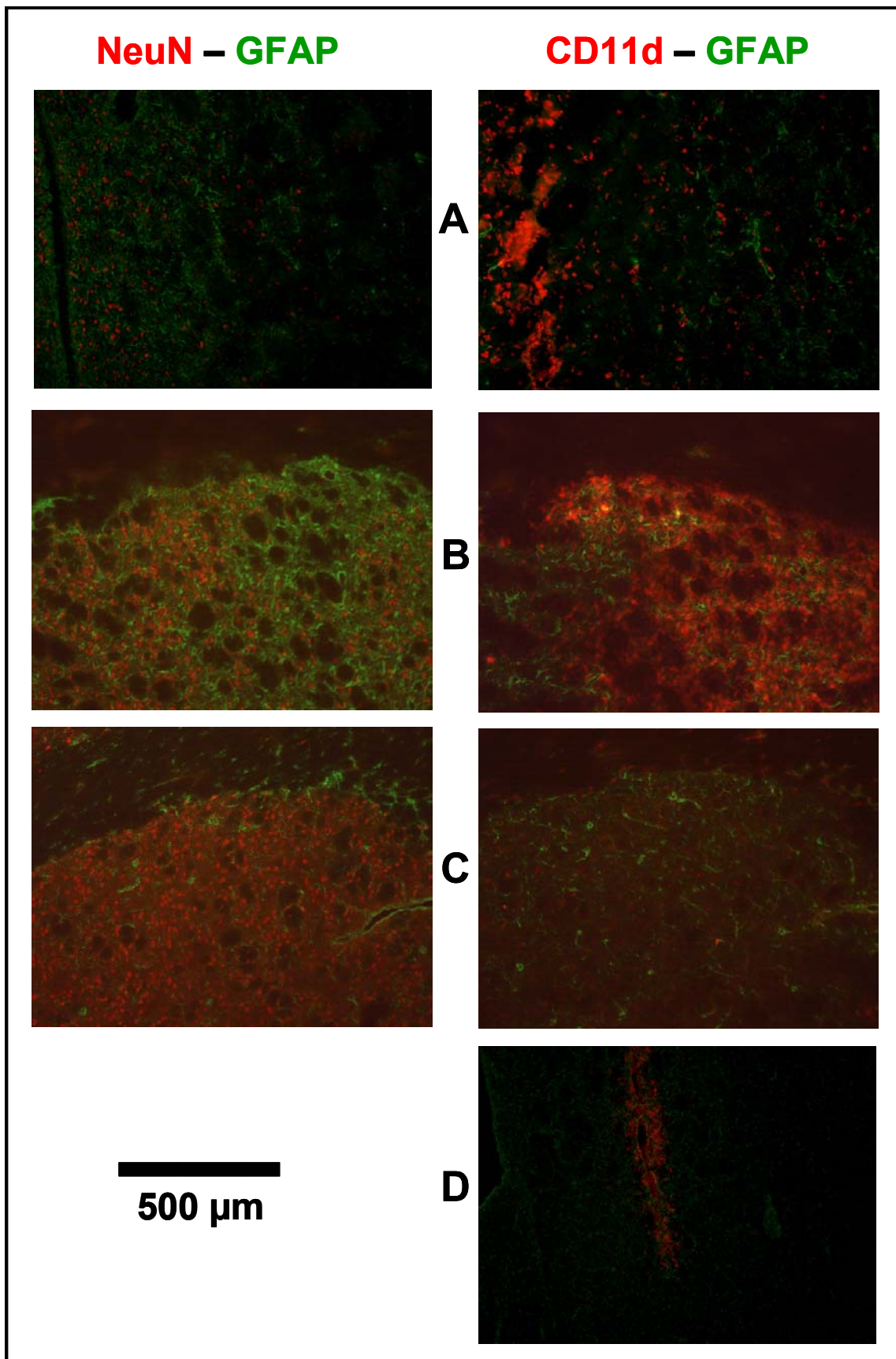


Figure 2. Caractérisation immunohistochimique de la lésion AMPA par marquage simultané des astrocytes réactifs (**GFAP**) et des neurones (**NeuN**) (colonne de gauche) ou des astrocytes réactifs (**GFAP**) et des macrophages (**CD11b**) (colonne de droite). Animal sacrifié 48h après l'injection (**A**),

7 jours après l'injection, côté ipsilatéral (B), et controlatéral (C) ; animal sacrifié 7 jours après injection de PBS (D).

La dynamique de la réaction inflammatoire entre les 2^{ème} et 7^{ème} jours suivant l'injection d'AMPA a été suivie de manière quantitative par autoradiographie au [³H]-(R,S)-PK11195, en utilisant un excès de 4'-chlorodiazepam (Ro5-4864) pour évaluer le signal non spécifique (Fig. 3). La localisation du signal est en accord avec l'étude histologique et immunohistochimique, mais le signal est plus diffus à 2 jours qu'à 7 jours, où la lésion est parfaitement délimitée (Fig. 3B et 3C). La quantité de sites de liaison est stable du côté controlatéral, montrant une absence d'activation microgliale détectable à distance du site d'injection. Elle est multipliée par 1,8±0,2 dans la lésion après 2 jours, et par 3,0±0,4 après 3 jours, sans plus de variation significative à 4 et 7 jours (2,6±0,5 et 2,7±0,4 respectivement). La liaison non spécifique (non déplacée par un excès de Ro5-4864) est similaire dans et hors de la lésion, et constante au cours du temps. De fait, la lésion spécifique du PBR représente en moyenne 15% de la liaison totale du côté controlatéral (2-3 dpm/mm³), et, du côté ipsilatéral, 50% à 2 jours post-lésion (15 dpm/mm³), et 70% ensuite (30 dpm/mm³). Cela représente une induction d'un facteur 6 à 2 jours et d'un facteur 15 en moyenne (min-max : 9-19) entre 3 et 7 jours (Fig. 3A).

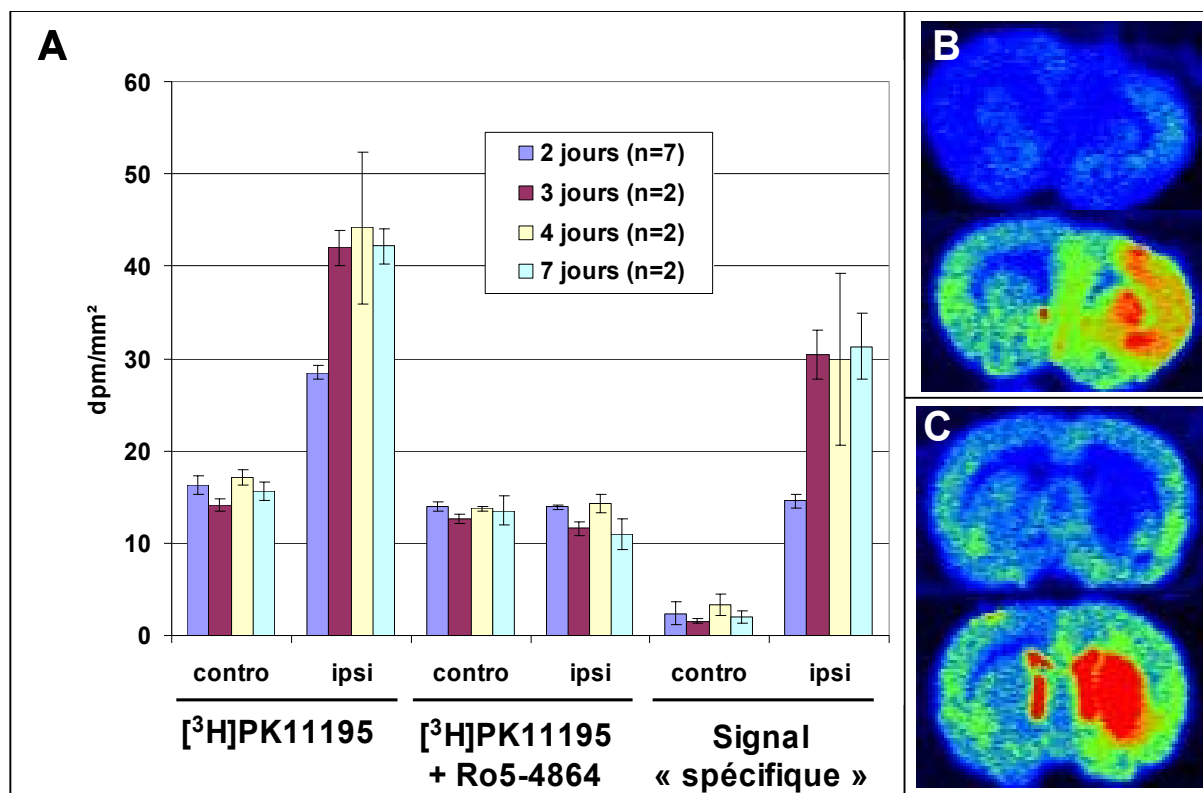


Figure 3. (A) Evolution temporelle de la quantité (moyenne±écart-type) de sites de liaison du [³H]PK11195 entre 2 et 7 jours, au niveau de la lésion et dans la zone symétrique de celle-ci du côté controlatéral. Autoradiographies à 2 (B) et 7 (C) jours avec pour chacun, [³H]PK11195 (nM) en bas, et [³H]PK11195 (nM) + Ro5-4864 (20µM) en haut. (D. Briet & M.-N. Castel, Sanofi-Aventis, Vitry)

L'état de la barrière hémato-encéphalique a été évaluée par injection systémique de Bleu Evans (4ml/kg). Deux jours après la chirurgie, une forte coloration est observée dans le striatum (Fig. 4A) et le cortex le long de la descente d'aiguille. Après 7 jours, la coloration est absente du parenchyme cérébrale, ou de faible intensité (Fig. 4B).



Figure 4. Extravasation de bleu Evans 2 jours (A), et 7 jours (B) après l'injection d'AMPA.

La validation de ce modèle de neuroinflammation aiguë pour l'imagerie a été réalisée avec le [^{11}C]-(*R*)-PK11195 ([^{11}C]-PK11195 ci-après) sous une caméra TEP dédiée au petit animal (Focus 220, Siemens). En cohérence avec les résultats de l'autoradiographie, la lésion apparaît peu contrastée 2 jours après l'injection d'AMPA (Fig. 5), mais est parfaitement visualisée dès le 4^{ème} jour suivant la chirurgie (Fig. 4).

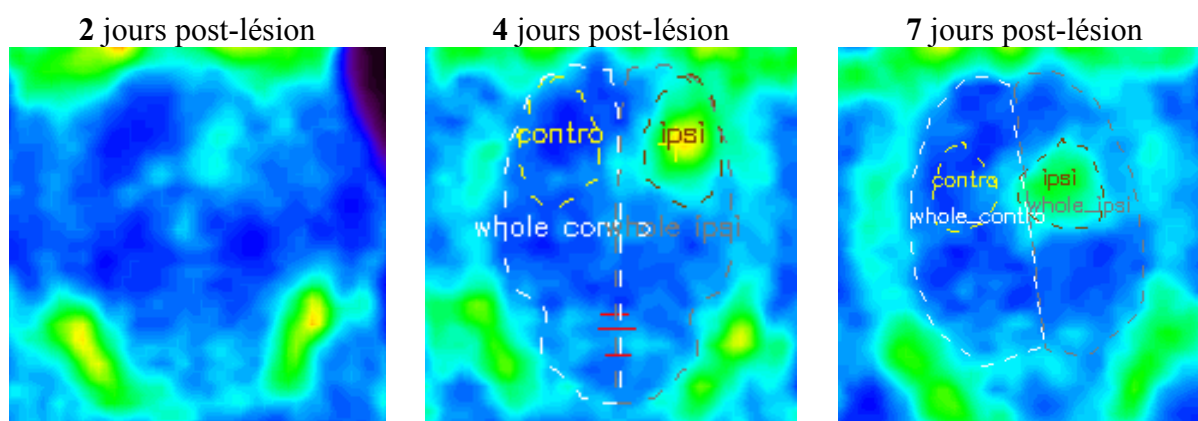


Figure 5. Imagerie TEP de la lésion AMPA avec [^{11}C]-PK11195 à 2, 4, et 7 jours (images après 70 min d'acquisition ; coupe longitudinale).

Sur la base de ces résultats, l'évaluation des ligands a été réalisée 7 jours après l'injection d'AMPA, afin de permettre à la BHE d'être partiellement reformée, tout en bénéficiant d'une forte expression du PBR.

En l'absence de repères anatomiques précis, 2 couples de régions d'intérêt (ROI) permettent la quantification des examens par imagerie TEP :

- « ipsi » est dessinée manuellement par isocontour (30 à 40% du voxel le plus actif dans la zone lésée) sur l'image intégrant le signal sur toute la durée de l'examen ;
- « contro » est la région symétrique de « ipsi » dans l'hémisphère non lésé ;
- « ipsi-cœur » est définie par un volume sphérique de 10 mm³ généré au centre de la lésion sur l'image intégrant le signal sur toute la durée de l'examen ;
- « contro-cœur » est la région symétrique de « ipsilatéral-cœur » dans l'hémisphère non lésé.

Ainsi, le signal est quantifié à la fois dans l'ensemble de la zone lésée, et dans une région constante de taille inférieure. Les résultats obtenus avec le [^{11}C]-PK11195 sont présentés ci-dessous, en comparaison avec les autres radioligands.

1-2) Comparaison des radiotraceurs testés

Nous avons évalué sur ce modèle de neuroinflammation aigue 4 composés marqués au carbone 11 et un composé marqué au fluor 18, comparativement au [¹¹C]PK11195 (tab. 1).

1-2-1) Autoradiographie

Les radioligands [¹¹C]DPA-713, [¹⁸F]DPA-714, [¹¹C]CLINME, et [¹¹C]SSR180575 ont été utilisés en autoradiographie in vitro, sur des coupes de cerveaux de rats lésés ou non opérés. Le protocole était similaire à celui-ci utilisant le PK11195 tritié (Fig. 3), mais la durée d'incubation (de 60 min) a été ramenée à 20 min en raison de la courte période du radioisotope carbone-11.

Le tableau 2 résume les conditions et les principaux résultats obtenus, et la figure 6 réunit l'ensemble des résultats sous forme graphique.

| RADIOTRACEUR | RAS (mCi/μmol) à l'incubation | concentration | ratio ipsi/contro (min-max) | compétition | liaison déplacée: ipsilatéral | liaison déplacée: controlatéral | ratio ipsi/contro (min-max) |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| [¹¹C]DPA-713 | 688 | 29 nM | 6,2 (5,0 – 7,8) | Flumazenil (11 μM) | 9% | 18% | 6,9 (5,3 – 8,8) |
| | | | | PK11195 (25 μM) | 93%* | 66%* | 1,2 (0,7 – 2,1) |
| | | | | DPA-713 (25 μM) | 98%* | 85%* | 1,0 (0,8 – 1,3) |
| | | | | CLINME (17 μM) | 97%* | 80%* | 1,0 (0,9 – 1,2) |
| [¹⁸F]DPA-714 | 3663 | 2 nM | 5,0 (3,8 – 6,9) | Flumazenil (22 μM) | 6% | 24%* | 6,3 (4,7 – 8,4) |
| | | | | PK11195 (25 μM) | 99%* | 97%* | 1,6 (1,1 – 2,6) |
| [¹¹C]CLINME | 1309 | 16 nM | 1,8 (1,3 – 2,6) | Flumazenil (21 μM) | 8% | 3% | 1,8 (1,3 – 2,5) |
| | | | | PK11195 (29 μM) | 62%* | 17% | 0,8 (0,6 – 1,2) |
| | | | | CLINME (21 μM) | 76%* | 48%* | 0,9 (0,3 – 2,0) |
| | | | | DPA-713 (21 μM) | 70% | 36% | 0,9 (0,6 – 1,1) |
| [¹¹C]SSR180575 | 872 | 18 nM | 3,8 (2,3 – 6,7) | Flumazenil (27 μM) | 23%* | 17% | 3,5 (2,2 – 6,3) |
| | | | | PK11195 (23 μM) | 88%* | 54% | 1,0 (0,7 – 1,5) |
| | | | | SSR180575 (22 μM) | 88%* | 53% | 1,0 (0,7 – 1,5) |
| [³H]PK11195 | 83,5 | 18 nM | 2,7 (2,4 – 3,0) | Ro5-4864 (20 μM) | 74%* | 13% | 0,8 (0,6 – 1,1) |

Tableau 2. Conditions et quantification comparatives des autoradiographies présentées figures 3 ([³H]PK11195) et 6 ([¹¹C]DPA-713, [¹⁸F]DPA-714, [¹¹C]CLINME, et [¹¹C]SSR180575). RAS = RadioActivité Spécifique ; min = (moyenne ipsi – écartype)/(moyenne contro + ecartype) ; max = (moyenne ipsi + écartype)/(moyenne contro – ecartype) ; * indique une différence significative par rapport à la condition sans compétiteur pour le même hémisphère cérébral.

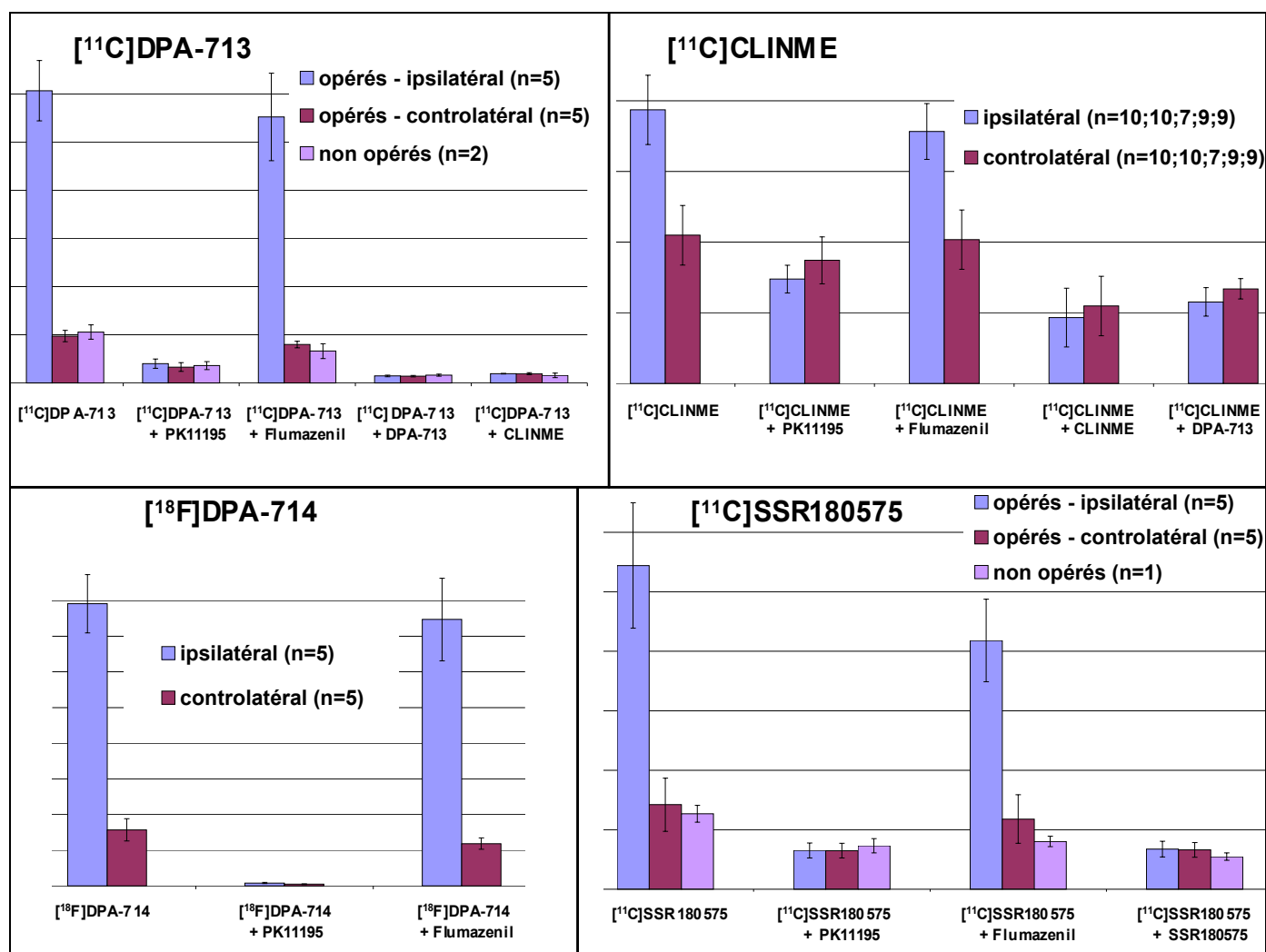


Figure 6. Quantification des autoradiographies in vitro sur coupes de cerveaux de rats. La spécificité de chaque radioligand est vérifiée par un excès de ligand non radiomarqué. La quantification (moyenne±écart-type) est réalisée dans une région d'intérêt au niveau de la lésion (ipsilatéral), et dans la région symétrique de l'hémisphère non lésé (controlatéral), pour la condition d'incubation sans ligand compétiteur. Les régions d'intérêt sont ensuite reportées sur les coupes adjacentes dans les conditions d'incubation avec compétiteur. La quantification est relative à chaque radioligand (échelle en dpm/unité d'aire arbitraire).

Pour obtenir une fixation reflétant le nombre maximal de sites de liaison spécifiques (B_{max}) en autoradiographie sur coupes, il faut en général incubé à une concentration proche de $4 \cdot K_d$, qui assure une occupation d'environ 80% des sites de liaison spécifiques, avec une contribution faible des sites de liaison non spécifiques. En accord avec des constantes d'inhibition de la liaison de [³H]PK11195 variant de 5 à 10 nM pour les différents ligands, les concentrations en radioligands varient de 15 à 30 nM, excepté [¹⁸F]DPA-714, incubé à 2 nM. Pourtant, le contraste obtenu avec ce ligand est excellent, signe qu'une fraction suffisante des sites de liaison a été révélée. De plus, ce radiotracer fluoré a permis d'acquérir plus de signal que les radioligands marqués au carbone 11. Néanmoins, dans ces conditions, la liaison non spécifique de cette molécule a pu être sous-évaluée par rapport à celle des autres ligands.

Tous les radioligands permettent de visualiser la lésion (différence ipsi vs contro significative) et de confirmer sa localisation en cohérence avec l'immunohistochimie et l'histologie. Les 3 composés DPA-713, DPA-714, et SSR180575 se distinguent par un contraste (ratio ipsi/contro) très élevé, globalement 2 à 3 fois supérieur à celui des autres

composés. Ce contraste est aboli en présence d'un excès de ligand du PBR, confirmant sa sur-expression au niveau du site lésionnel.

La liaison des radioligands du côté ipsilatéral est efficacement « déplacée » (de 62% pour le CLINME à 99% pour le DPA) par un excès co-incubé de (R,S)-PK11195, alors que le déplacement par le flumazenil, ligand des récepteurs centraux aux benzodiazepines, est non significatif (et inférieur à 20%) sauf dans le cas du SSR180575 (côté ipsi) et du DPA-714 (côté contro). Le déplacement par le ligand lui-même est également efficace, et DPA-713 et CLINME se déplacent mutuellement. Nous concluons qu'un site de liaison majoritaire spécifique du PBR est partagé par l'ensemble de ces ligands. Le déplacement parfois significatif d'une fraction du radioligand par un excès de flumazenil n'est pas de nature à remettre en cause la spécificité bien établie (tab. 1) *in vitro* vis-à-vis des récepteurs centraux. Le report de régions d'intérêt sur des coupes adjacentes peut induire ce type de variations.

On note également une fraction déplaçable par le PK11195 du côté controlatéral, révélant un certain nombre de sites de liaison spécifique. Cette fraction est très faible pour CLINME (17%) et pour le PK11195 lui-même (13% seulement de la liaison de [³H]PK11195 du côté non lésé est déplacé par Ro5-4864 en excès). Elle dépasse 50% pour les 2 composés DPA (différence significative) et le SSR180575 (différence non significative), ce qui suggère la mise en évidence d'une expression non négligeable du PBR du côté controlatéral, grâce à une diminution de la liaison non spécifique par rapport au PK11195.

Par ailleurs, cette fraction déplaçable du côté non lésé est augmentée en utilisant le ligand lui-même dans le cas du DPA-713 (66 à 85%) et du CLINME (17 à 48%). Plusieurs raisons, qui ne sont pas exclusives, peuvent expliquer cette variation dans une zone de faible expression du PBR.

- L'expression basale du PBR par la microglie quiescente est la première hypothèse, car la spécificité du PK11195 sur un tissu sain est discutable, d'après les études de microautoradiographie publiées (15, 16).
- Une autre hypothèse tient à la nature chimique des molécules, qui appartiennent à des classes chimiques différentes. Des modèles pharmacophores différents ont été construits pour les isoquinolines (PK11195) (17, 18), pyrazolopyrimidines (DPA) (19), et les imidazopyridines (CLINME) (20). Des sites de liaison proches, mais pas identiques, peuvent engendrer de telles différences dans les déplacements.
- Enfin, la molécule radiomarquée et non radiomarquée partagent le même site de liaison spécifique de haute affinité (PBR) ainsi que des sites « non spécifiques » (différents du PBR) de faible affinité, dont certains peuvent être déplacés.

Dans le cas du [¹¹C]DPA-713 et du [¹¹C]SSR180575, des coupes issues d'animaux non opérés ont également été utilisées. La fixation est similaire à celle de l'hémisphère intact des animaux opérés, montrant qu'à 7 jours post-lésion, il n'existe pas d'activation microgliale notable au côté contralatéral.

Tels que, les comparaisons entre radioligands doivent être interprétés avec prudence, puisque les radioactivité spécifiques ne sont pas homogènes, et que l'équilibre n'est pas forcément atteint pour tous les ligands au bout de 20 min. A ce titre, une autoradiographie réalisée dans ces conditions avec [¹¹C]PK11195 (RAS 1269 mCi/μmol ; 15 nM) ne fournit aucun contraste, confirmant une cinétique de liaison lente pour ce ligand (21), qui peut biaiser totalement les résultats obtenus dans le protocole ci-dessus.

1-2-2) Imagerie TEP

L'imagerie TEP a été réalisée dans des conditions identiques pour le [¹¹C]PK11195 et les autres radiotraceurs. Les courbes de liaison ont été modélisées par le modèle simplifié avec région de référence (22). La spécificité a été évaluée par injection d'un excès de ligand non radiomarqué (1 mg/kg) 20 minutes après l'injection du radiotraceur. Sur des groupes d'animaux différents, une analyse des métabolites plasmatiques et cérébraux a été conduite.

Le tableau 3 récapitule les données concernant les injections de radiotraceurs sous caméra. Les doses injectées sous caméra étant constantes (autour de 2 mCi), les différences entre radiotraceurs proviennent de la radioactivité spécifique (RAS). La variabilité importante du groupe [¹¹C]PK11195 est due à la présence d'un examen réalisé avec une RAS très faible. Les résultats de cet examen ont été inclus dans l'analyse car ils ne différaient pas sensiblement des autres examens réalisés avec ce radioligand, en dépit de la grande quantité de matière injectée (23,7 nmol). Le groupe [¹⁸F]DPA-714 présente également une variabilité importante en terme de RAS et donc de quantité injectée, puisque le produit d'une seule radiosynthèse est utilisé pour réaliser l'imagerie de 4 rats consécutivement.

| RADIOTRACEUR (n) | Activité injectée (mCi) (MBq) | RAS à l'injection (mCi/μmol) (GBq/μmol) | Quantité injectée (nmol) | Quantité injectée en déplacement <composé> : (mg/kg) |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------|--|
| [¹¹ C]PK11195 (n=5) | 2,6 ± 0,4 95 ± 15 | 830 ± 650 31 ± 24 | 8,2 ± 9,4 | - |
| [¹¹ C]DPA-713 (n=12) | 1,9 ± 0,2 72 ± 9 | 1460 ± 470 54 ± 17 | 1,4 ± 0,4 | PK11195 : 1,2 ± 0,3 DPA-713 : 1,0 ± 0,1 |
| [¹⁸ F]DPA-714 (n=14) | 1,9 ± 0,2 70 ± 7 | 1480 ± 1110 55 ± 41 | 2,3 ± 2,1 | PK11195 : 1,4 ± 0,8 DPA-714 : 1,0 ± 0,1 |
| [¹¹ C]DPA-715 (n=3) | 2,4 ± 0,5 89 ± 17 | 1320 ± 360 49 ± 13 | 1,9 ± 0,2 | PK11195 : 1,5 |
| [¹¹ C]CLINME (n=13) | 2,1 ± 0,4 77 ± 15 | 1270 ± 600 43 ± 19 | 1,9 ± 0,7 | PK11195 : 1,1 ± 0,1 CLINME : 1,1 ± 0,1 |
| [¹¹ C]SSR180575 (n=9) | 2,5 ± 0,3 91 ± 10 | 1360 ± 320 47 ± 12 | 2,2 ± 0,9 | PK11195 : 1,1 ± 0,2 SSR180575 : 1,4 ± 0,3 |

Tableau 3. Quantités de radioligands et de ligands non radiomarqués injectées. Toutes les injections ont été réalisées en i.v. (veine caudale) après pose d'un cathéter. n représente le nombre total d'examens d'imagerie réalisés avec un radiotraceur donné. RAS = RadioActivité Spécifique. Le PK11195 utilisé pour les déplacements est le composé racémique.

Les résultats issus de la quantification de l'ensemble de la lésion (ROI « ipsi » et « contro »), ainsi que la détection de métabolites, sont présentés sous la forme suivante, ci-jointe, dans cet ordre :

❖ [¹¹C]DPA-713 : publication

Boutin, H., Chauveau, F., Thominaux, C., Gregoire, M.C., James, M.L., Trebossen, R., Hantraye, P., Dolle, F., Tavitian, B. and Kassiou, M. (2007) 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for *in vivo* imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med*, 48(4): 573-581.

❖ [¹¹C]CLINME : publication

Boutin, H., Chauveau, F., Thominiaux, C., Kuhnast, B., Grégoire, M.C., Jan, S., Trebossen, R., Dollé, F., Tavitian, B. Mattner, F. and Katsifis, A. (2007) In vivo imaging of brain lesions with [¹¹C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia*, 55(14):1459-1468.

❖ [¹¹C]DPA-715 : publication (poster abstract)

A.H. Creelman, C. Thominiaux, F. Chauveau, R. Fulton, B. Kuhnast, D. Henderson, H. Boutin, S. Selleri, I. McGregor, P. Hantraye, B. Tavitian, F. Dollé, and M. Kassiou (2007) Synthesis and evaluation of the translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligand [¹¹C]DPA-715 in rat and non-human primate. *J Label Comp Radiopharm*, 50, S354.

❖ [¹¹C]SSR180575 : extrait du rapport au partenaire industriel

F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominiaux, Hantraye, P., Dolle, F., Tavitian, B. and J. Benavides (2007) Report on radiolabeling of SSR180575 and animal PET imaging.

NB:

i) la publication [¹¹C]CLINME et le rapport [¹¹C]SSR180575 contiennent les résultats de l'autoradiographie déjà présentée dans les pages 158 à 160 (fig.6 & tab.2) ;

ii) le radiotracer [¹⁸F]DPA-714, évalué récemment, n'a pas encore fait l'objet d'une analyse détaillée. Des résultats préliminaires sont présentés par la suite.

Texte intégral :

Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Grégoire MC, James ML, Trebossen R, Hantraye P, Dollé F, Tavitian B, Kassiou M. 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med.* **2007**;48(4):573-581. doi:[10.2967/jnumed.106.036764](https://doi.org/10.2967/jnumed.106.036764)

Texte intégral :

Boutin H, Chauveau F, Thominiaux C, Kuhnast B, Grégoire MC, Jan S, Trebossen R, Dollé F, Tavitian B, Mattner F, Katsifis A. In vivo imaging of brain lesions with [(11)C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia*. **2007**;55(14):1459-1468. doi:[10.1002/glia.20562](https://doi.org/10.1002/glia.20562)

P267 SYNTHESIS AND PET EVALUATION OF THE TRANSLOCATOR PROTEIN (18 kDa) (TSPO) LIGAND [¹¹C]DPA-715 IN RAT AND NON-HUMAN PRIMATE

A. CREELMAN¹, C. THOMINIAUX², F. CHAUVEAU², R. FULTON³, B. KUHNAST², D. HENDERSON³, H. BOUTIN², S. SELLERI⁴, I. MCGREGOR¹, P. HANTRAYE², B. TAVITIAN², F. DOLLE², and M. KASSIOU¹

¹University of Sydney, Australia; ²Service Hospitalier Frédéric Joliot, France; ³RPAH, Australia; ⁴Università di Firenze, Italy

Introduction. The translocator protein (18kDa) (TSPO), formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), is over expressed upon microglial activation. Such activation is present in a number of neurodegenerative conditions suggesting that imaging may provide disease location, chronicity and progression. This study involved the evaluation of the pyrazolopyrimidine DPA-715 (TSPO Ki = 16.4 nM) in behavioural studies and the radiolabelled form, [¹¹C]DPA-715, in healthy non-human primate and AMPA-lesioned rats as a model of activated microglia using PET.

Experimental. The *in vivo* anxiolytic effects of DPA-715 were assessed using the social interaction test which represents social anxiety in humans. DPA-715 was administered at 0.5 mg/kg, 5 mg/kg and 20 mg/kg doses. A vehicle only rat was used as a behavioural control. [¹¹C]DPA-715 was prepared using [¹¹C]CH₃I as the labelling intermediate from the phenolic precursor of DPA-715 using TBAH and DMF followed by HPLC. The non-human primate distribution studies were performed using a clinical PET scanner, and AMPA-lesioned rats using microPET. Blocking studies were conducted using PK11195 (5 mg/kg).

Results and Discussion. In the social interaction test a significant overall effect for the duration of time spent in general investigation, adjacent lying and rearing was observed. Post hoc analysis revealed a significantly greater time spent in general investigation and adjacent lying in the 20 mg/kg DPA-715 treatment group compared to vehicle treated rats. In PET radiolabelling experiments, the average non-decay corrected RCY of [¹¹C]DPA-715 was 0.27 ± 0.05% with an average s.a. of 16.32 ± 4.01 GBq/μmol. The baboon PET distribution studies revealed poor brain uptake. Pre-treatment with PK11195 resulted in no change of radioligand uptake, which suggests that this brain uptake is representative of non-specific binding. In agreement with these results, the brain uptake in the AMPA-lesioned model, depicted no significant differences between the lesioned striatum and the non-lesioned contralateral striatum (Fig. 1).

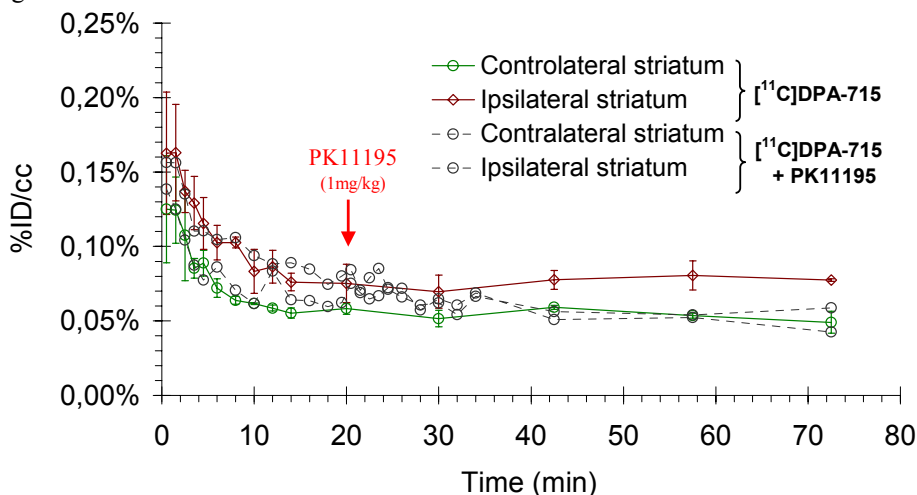


Fig. 1. Time-activity curve for [¹¹C]DPA-715 (n=2) and [¹¹C]DPA-715 + PK11195 (n=1).

Conclusion. Although DPA-715 does possess anxiolytic properties *in vivo*, [¹¹C]DPA-715 does not possess the required properties for further development as a PET radioligand for imaging the TSPO (18 kDa).

Keywords: TSPO (18kDa), PBR, Carbon-11, DPA-715, Anxiolytic



REPORT ON RADIOLABELING OF SSR180575 AND PET IMAGING

PART ONE: ACUTE NEUROINFLAMMATION MODEL

(Ces résultats sont la propriété de Sanofi-Aventis.)

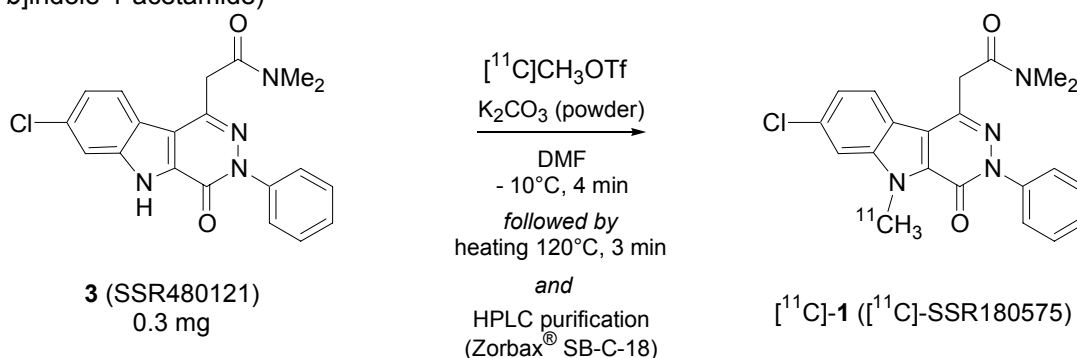
METHODS

Radiosynthesis of ligands

[¹¹C]-(*R*)-PK11195

((*R*)-*N*-Methyl-*N*-(1-methylpropyl)-1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxamide) was labelled with carbon-11 at its amide moiety from the corresponding *nor*-derivative ((*R*)-*N*-(1-methylpropyl)-1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxamide) using [¹¹C]methyl iodide (Both *nor*-(*R*)-PK11195 and PK11195 were kindly provided by Sanofi-Aventis). Typically, about 4.80 GBq of (*R*)-[¹¹C]PK11195 (> 98% radiochemically pure) was routinely obtained within 25 minutes of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation) with specific radioactivities ranging from 75 to 90 GBq/μmol.

[¹¹C]SSR180575 (7-Chloro-*N,N*,5-[¹¹C]trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide)



Synthesis : SSR180575 (**1**) was isotopically labelled with carbon-11 ($T_{1/2}$: 20.38 min) at its methyl indole moiety from the corresponding *nor*-analogue (**3**) using [¹¹C]methyl triflate and the following experimental conditions : (i) trapping at -10°C of [¹¹C]methyl triflate in DMF (300 μL) containing 0.2 to 0.3 mg of the precursor for labelling and 4 mg of powdered potassium carbonate (excess) ; (ii) heating at 120°C for 3 minutes ; (iii) taking-up the mixture with 0.5 mL



of the HPLC mobile phase and (iv) purification using semi-preparative HPLC (Zorbax® SB-C-18 ; eluant : 0.9% aq. NaCl / EtOH / 1M aq. phosphate buffer (pH 2,3) : 50 / 50 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 6 mL/min ; Rt : 8.0-8.5 minutes). Typically, starting from a 1.5 Ci (55.5 GBq) [¹¹C]CO₂ production batch, > 100 mCi (> 3.7 GBq) of [¹¹C]SSR180575 were obtained within a total synthesis time of 20-25 minutes (HPLC-purification included). Specific radioactivities ranged from 1.43 to 1.95 Ci/μmol (52.9-72.2 GBq/μmol) at the end of radiosynthesis.

Formulation : The HPLC-solution containing pure [¹¹C]SSR180575 was diluted with aq. 0.9% NaCl (physiological saline) to an ethanol concentration below 10%

Quality Control : The radiotracer preparation was a clear and colourless solution with a measured pH between 5 and 7. As demonstrated by analytical HPLC* analysis, the radiotracer preparation was found to be > 95% chemically and radiochemically pure (*t_R* : 2.38 min). The preparation was shown to be free of non-radioactive precursor and was chemically and radiochemically stable for at least 60 minutes.

* **Equipment** : Waters Alliance 2690 equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996) and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column : analytical Symmetry-M® C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity : 5 μm ; conditions : eluent : solvA/solvB : 40/60 (v/v) [solvA : H₂O containing Low-UV PIC® B7 reagent (% by weight : methanol (18-22%), heptane sulfonic acid-sodium salts (4-6%), phosphate buffer solution (3-7%), water (65-75%), pH 3, Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB : H₂O/CH₃CN : 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC® B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; flow rate : 2.0 mL/min ; temperature : 30°C ; UV detection at λ : 253 nm.

Surgery

All studies were conducted in accordance with the French legislation and European directives. Wistar rats (average body weight 300g, centre d'Élevage René Janvier, France) were kept in thermoregulated, humidity controlled facilities under a 12h/12h light/dark cycle (light on between 7h AM and 7h PM) and were allowed free access to food and water. Anaesthesia was induced by isoflurane 5%, and thereafter maintained by 2-2.5% in a mixture 70%/30% NO₂/O₂. AMPA (15mM in PBS buffer, Sigma®) was stereotaxically injected through the use of a 1μl microsyringe and micropump (injection rate: 0.5μl/min, UltraMicroPump II® and Micro4® Controller, WPI Inc., USA). AMPA (0.5μl) was injected in the right striatum (Bregma +0.7mm, from sagittal suture: 2.7mm, depth from brain surface: 5.5mm). Animals were maintained normothermic (body temperature: 36.7±0.5°C, mean±SD) during the surgery through the use of a heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Limited®, Edenbridge, Kent, UK).

MicroPET scans and data acquisition

MicroPET imaging was performed seven-days post-AMPA injection. Anaesthesia was induced by isoflurane 5%, and thereafter maintained by 2-2.5% of isoflurane in a mixture 70%/30% NO₂/O₂. For PET scans the head of the rat was placed in a home-made stereotaxic frame compatible with PET acquisition, and rats were maintained normothermic (rectal temperature: 36.7±0.5°C, mean±SD) through the use of a heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Limited®, Edenbridge, Kent, UK). All imaging protocols were conducted with a Concorde Focus 220 PET scanner using either [¹¹C]PK11195 or [¹¹C]SSR180575.

Radiolabelled compounds and unlabelled ligands (1mg/kg) were injected in the caudal vein through the use of 24 gauge catheter. Radiolabelled compounds were injected concomitantly to the start of PET acquisition and unlabelled compounds were injected 20min



after injection of radiotracers. PET data were acquired for 80min. Dose injected, number of animals, body weight, dose injected and specific radioactivity were as follows:

- [^{11}C]PK11195 (n=5) : $275\pm 50\text{g}$; 67.0-125MBq, 1.88-23.8nmoles
- [^{11}C]SSR180575 (n=3) : $300\pm 10\text{g}$; 79-103MBq, 1.30-2.23nmoles
- [^{11}C]SSR180575 + PK11195 (n=3) : $327\pm 40\text{g}$; 85-107MBq, 1.54-1.95nmoles
- [^{11}C]SSR180575 + SSR180575 (n=3) : $320\pm 10\text{g}$; 82-101MBq, 1.91-4.45nmoles

The PET acquisition was conducted with the time coincidence window set to 6ns and the levels of energy discrimination set to 350keV and 750keV. The list mode acquisition data files were histogrammed into 3D sinograms with a maximum ring difference of 47 and span 3. The list mode data of the emission scans were sorted into dynamic frames. The attenuation correction factors were measured using an external ^{68}Ge point source. Finally, the emission sinograms (each frame) were normalized, corrected for attenuation and radioactivity decay, and reconstructed using FORE and OSEM 2D (16 subsets and 4 iterations).

Image analysis

PET image analysis was performed using ASIPro VM™ (CTI Concorde Microsystems' Analysis Tools and System Setup/Diagnostics Tool). Regions of interest (ROIs) were delineated as "lesioned striatum" (as delineated by the hyper-signal seen in the sum-image) and "contralateral striatum" (as the mirror ROI, copied and symmetrically pasted into the contralateral hemisphere).

Metabolite analysis in blood and brain

Naive or operated adult male Wistar rats (body weight 300-400g) were injected i.v in the tail vein with [^{11}C]SSR180575. Animals were sacrificed 10, 20 or 30 minutes later. A blood sample was collected and plasma isolated by centrifugation (5min, 3000rpm). Plasma proteins were precipitated from 400 μL of serum by addition of 400 μL of acetonitrile. After centrifugation (5min, 3000rpm), the supernatant was injected onto the HPLC column. Rat brains were removed and hemispheres were separated. Homogenisation by sonication was performed in 1 mL of acetonitrile per hemisphere. After a rapid centrifugation, the supernatant was separated from the pellet and concentrated under reduced pressure before injection onto the HPLC (see radiochemistry section for HPLC conditions).

Autoradiography

[^{11}C]SSR180575 autoradiography was performed using 20 μm brain sections of rats (7-8 days post-lesion). Non-specific binding was assessed using an excess of either unlabelled PK11195 or SSR180575. Specificity for PBR vs central benzodiazepine binding sites was checked using an excess of unlabelled flumazenil. Sections were incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, adjusted at pH7.4 at 4°C, 50 mM with NaCl 120 mM), then rinsed 2 times for 2 min with cold buffer, followed by a quick wash in cold distilled water. Sections were then placed in direct contact with a Phosphor-Imager screen and exposed overnight; autoradiograms were analysed using ImageQuant™ software.

PET data modeling

Binding Potential was calculated for ipsilateral ROI kinetics using the PMOD software package (PMOD Technologies Ltd, version 2.5). The Single Reference-Tissue Model was used and the contralateral lesion-mirrored ROI was used as the Reference Region. Three parameters were estimated for each kinetics: R1 (k_1/k'_1) which represents the ratio of tracer delivery, k2

which is the clearance from the tissue into the vascular compartment, and the binding potential ($BP=k_3/k_4$).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD. Comparisons were performed using Mann-Whitney non-parametric test for PET data, and using ANOVA followed by a Bonferroni's test for autoradiographic data. For all statistical analyses, the significance level was $p<0.05$.



RESULTS

$[^{11}\text{C}]$ SSR180575 uptake is higher than that of $[^{11}\text{C}]$ PK11195 in the lesioned striatum, the region in which PBR expression is induced, while it is lower in the intact controlateral striatum which is expected to express no or non significant amounts of PBR (Figure 1). The differences are non significant. The ratio of uptake in lesioned-over intact striatum is higher for $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 than for $[^{11}\text{C}]$ PK11195, and this difference is significant (Figure 2). Binding potential as well as R_1 are significantly higher for $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 than for $[^{11}\text{C}]$ PK11195 ($BP = 1.65 \pm 0.36$ vs 0.66 ± 0.15 ; $R_1 = 1.26 \pm 0.08$ vs 1.10 ± 0.05).

Competition with PK11195, (1mg/kg i.v.; 20 min post $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 injection) displaces most of the tracer binding from the lesioned side (Figure 3). Competition with SSR180575 (1mg/kg i.v.; 20 min post $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 injection) has the same effect (Figure 4). Both competitors induce a small increase in $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 binding in the controlateral side, likely due to an increase in blood concentration of $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 as a consequence of the release of $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 from extra-cerebral binding sites.

Analysis of metabolites present in blood and plasma of rats at 10 and 20 minutes after $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 injection, and of metabolites present in brain of rats at 10, 20 and 30 minutes after $[^{11}\text{C}]$ SSR180575 injection detected essentially only the parent compound (Table 1).

Autoradiography on brain sections mirrored the imaging results with a high ipsi to contralateral ratio (3.8), which is abolished by an excess of PK11195 or SSR180575 (Figure 5). A slight but significant reduction of the staining is observed in the lesion when competing with an excess of flumazenil.

CONCLUSION

$[^{11}\text{C}]$ SSR180575 appears as an attractive alternative to $[^{11}\text{C}]$ PK11195 for the imaging of PBR over-expression in the AMPA-induced rat model of acute neuroinflammation.

FIGURE 1

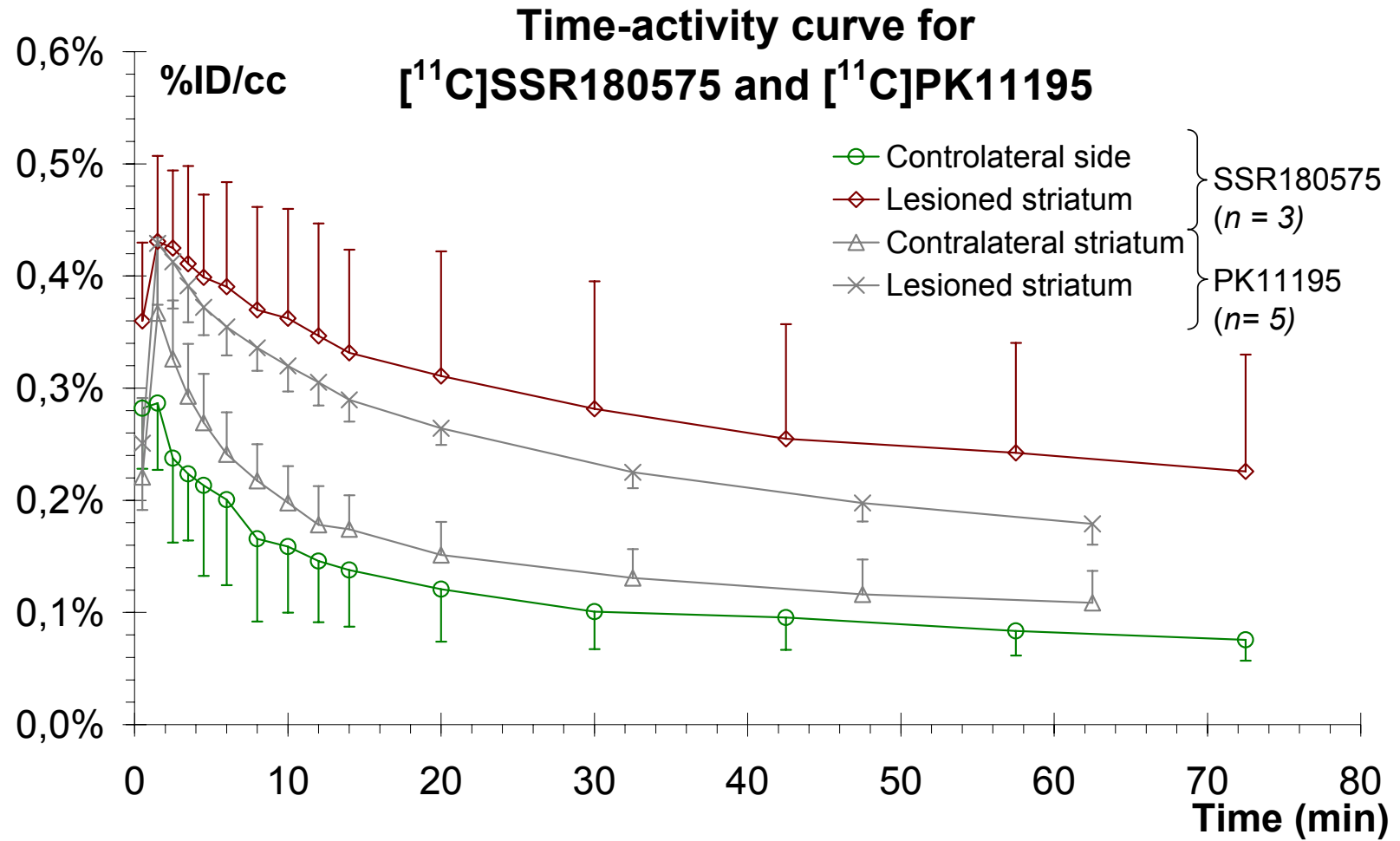


FIGURE 2

Ratio of uptake in lesioned over controlateral side

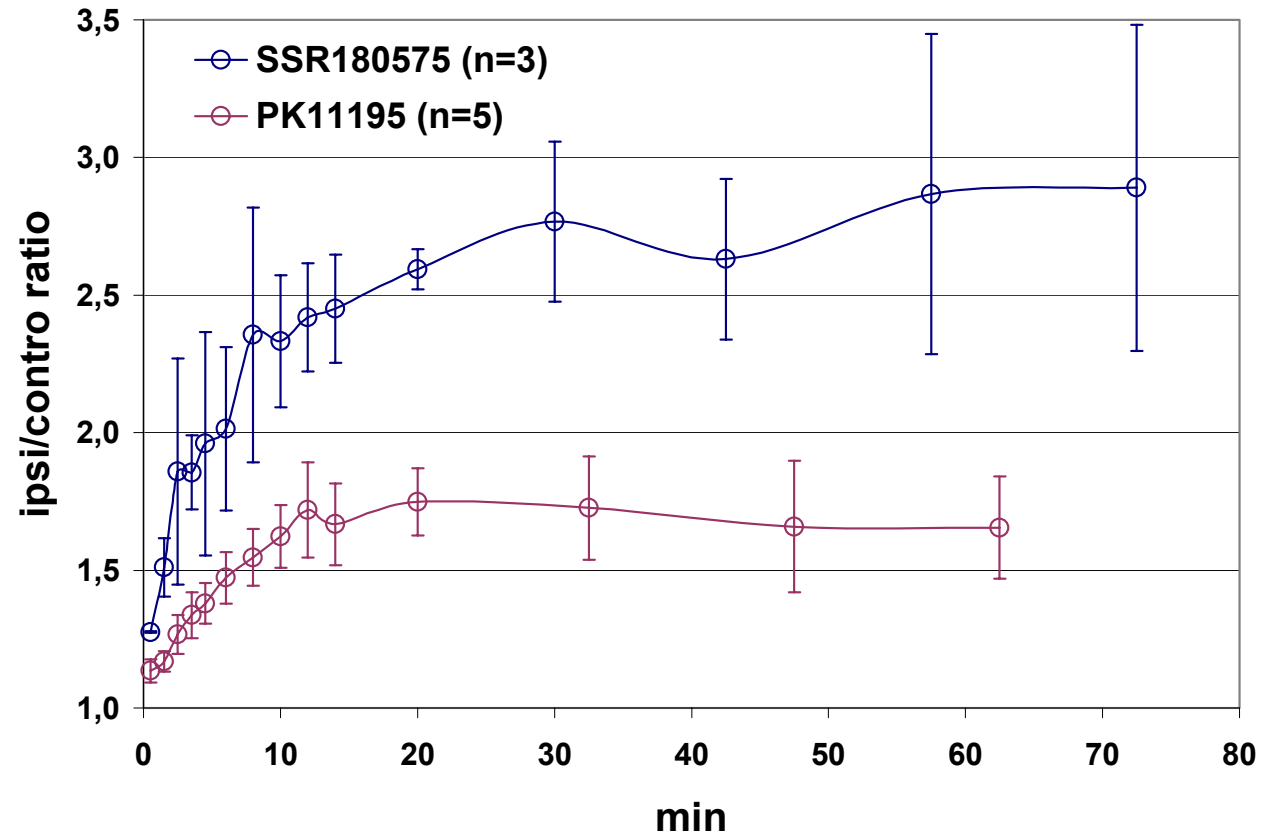


FIGURE 3





Mean time-activity curve for [¹¹C]SSR180575 (n=3)

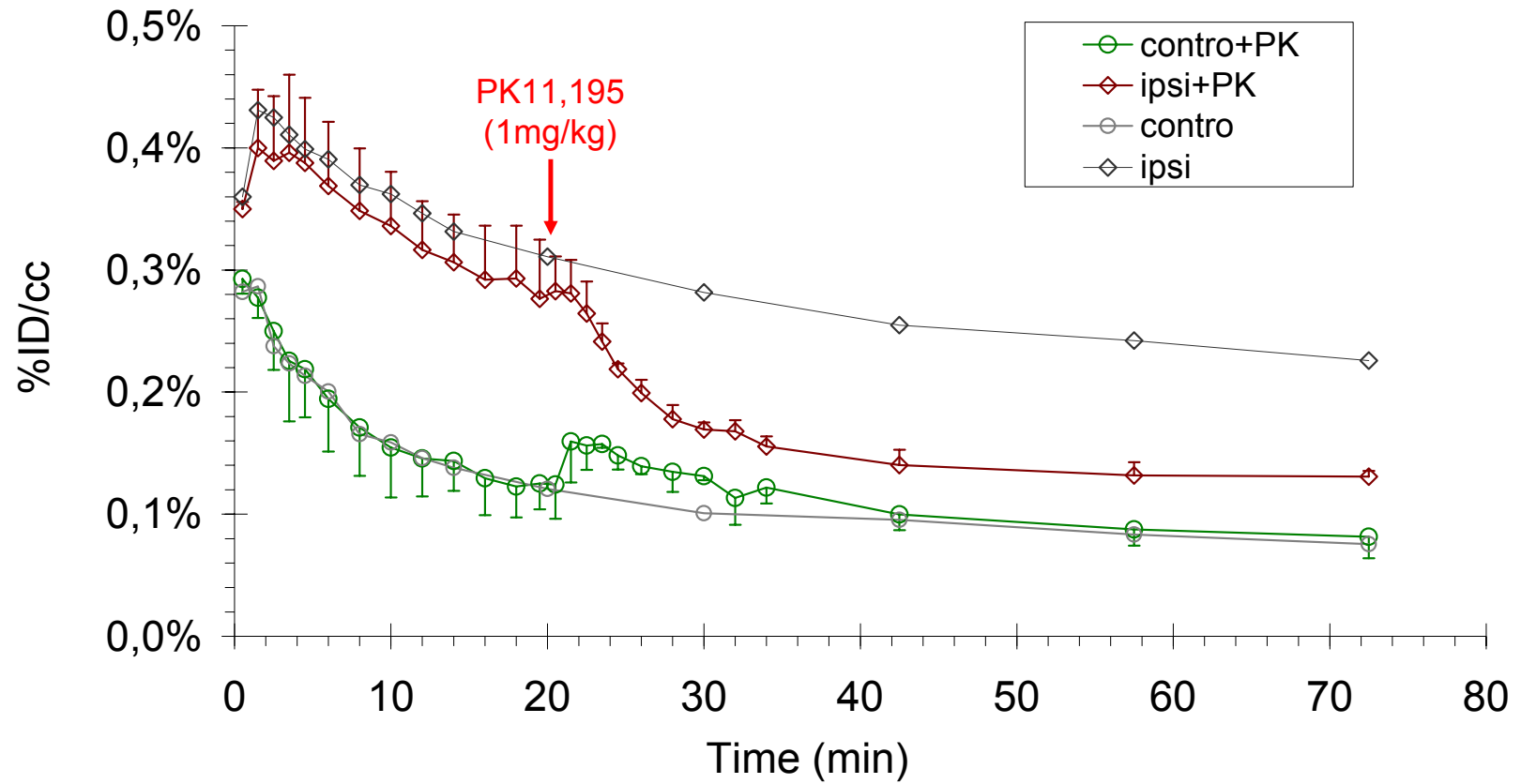
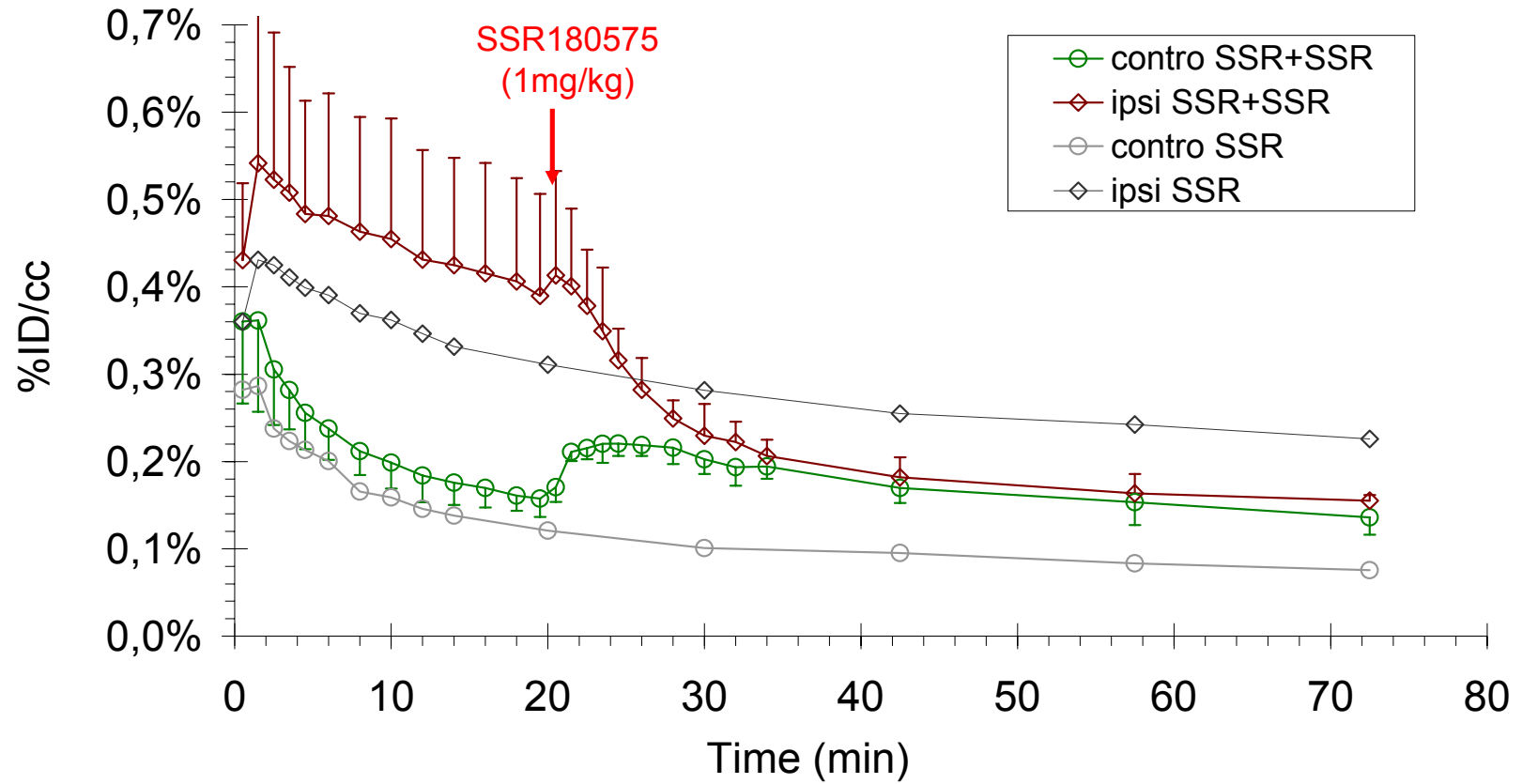


FIGURE 4



Mean time-activity curve for [¹¹C]SSR180575 (n=3)



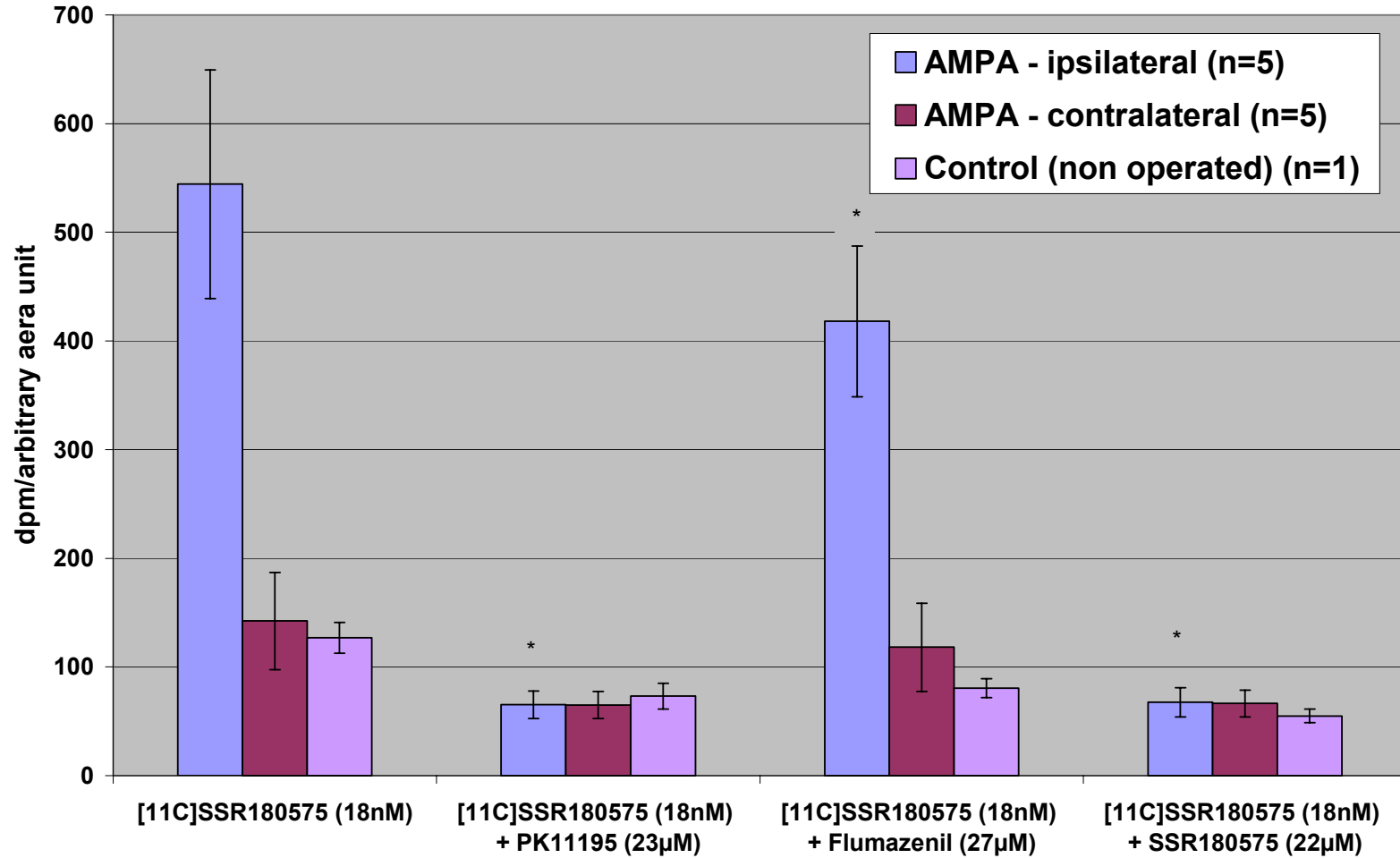
**TABLE 1**

| Ligand | Sacrifice (min post injection) | plasma/blood ratio | PLASMA | | | BRAIN | | |
|---------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | % HPLC intact form | Number of metabolites | Extraction yield | % HPLC intact form | Number of metabolites | Extraction yield |
| SSR180575 | 10 | 0,1 | 100 | 0 | 89 | 100 | 0 | 99 |
| SSR180575 | 20 | 0,1 | 100 | 0 | n.d. | 100/100 * | 0 | n.d. |
| SSR180575 | 30 | 0,1 | Undetectable level | | | 100/100 * | 0 | n.d. |

* lesioned / controlateral
side



FIGURE 5



* indicates a significant difference relative to the [¹¹C]SSR180575 (18nM) condition on the ipsilateral side. Variations on the contralateral side were not significant.

Résumé

Les radioligands [^{11}C]DPA-713 et [^{11}C]CLINME fournissent un contraste spécifique de l'expression du PBR, plus élevé que le [^{11}C]PK11195, essentiellement grâce à une fixation moindre dans l'hémisphère non lésé, alors que la fixation dans la lésion est similaire pour ces 3 composés. Nous interprétons ce résultat comme une réduction de la liaison non spécifique de [^{11}C]DPA-713 et [^{11}C]CLINME par rapport à celle du [^{11}C]PK11195, probablement due à une lipophilicité moindre de ces 2 composés.

Cette interprétation est également valable pour le [^{11}C]SSR180575. Celui-ci semble de plus exhiber une rétention supérieure au [^{11}C]PK11195 dans la lésion, même si la variation inter-individuelle est importante, et cette différence non significative. Le déplacement par le PK11195 ou le SSR180575 apparaît incomplet, et ceci est peut-être lié au caractère irréversible de la liaison, décrit *in vitro* (5).

Enfin, le [^{11}C]DPA-715, malgré sa forte lipophilicité, est très peu retenu dans l'ensemble du parenchyme cérébral. En conséquence, le contraste obtenu entre la zone lésée et le reste du cerveau est extrêmement faible.

Des métabolites de [^{11}C]DPA-713 et [^{11}C]CLINME sont formés dans le plasma, mais jusqu'à 30 minutes, seul le radioligand intact est détecté dans le cerveau, et donne lieu au signal observé. Le métabolisme du [^{11}C]DPA-715 et du [^{11}C]PK11195 (décrit chez l'homme et la souris (23)) n'a pas été analysé.

La figure 7 rassemble les résultats de la modélisation des courbes temps-activité (protocole d'imagerie sans déplacement) dans la ROI « ipsi », en utilisant comme région de référence la ROI « contro », selon le modèle simplifié avec région de référence. Les données du [^{11}C]DPA-715 n'ont pas été modélisées. Des 3 paramètres estimés, k_{2a} (non représenté) présente la plus grande imprécision (covariance à 10%). Cette constante de vitesse globale ou apparente du compartiment tissulaire (ligand lié) au compartiment sanguin varie peu selon les radioligands et les examens (0,1 à 0,4), sauf dans le cas d'un examen [^{11}C]SSR180575 (0,8).

R_1 , qui représente le ratio K_1 sur K_1' , est peu différent de 1, mais légèrement supérieur pour tous les ligands. Cette tendance à une entrée facilitée dans le tissu cible par rapport au tissu de référence reflète probablement une perméabilité supérieure de la BHE consécutive à la lésion. [^{11}C]SSR180575 et [^{11}C]DPA-713 fournissent des valeurs significativement différentes de celles du [^{11}C]PK11195.

Les valeurs du potentiel de liaison (BP), plus élevées que celles du [^{11}C]PK11195 pour les 3 radiotraceurs, reflètent le meilleur contraste obtenu.

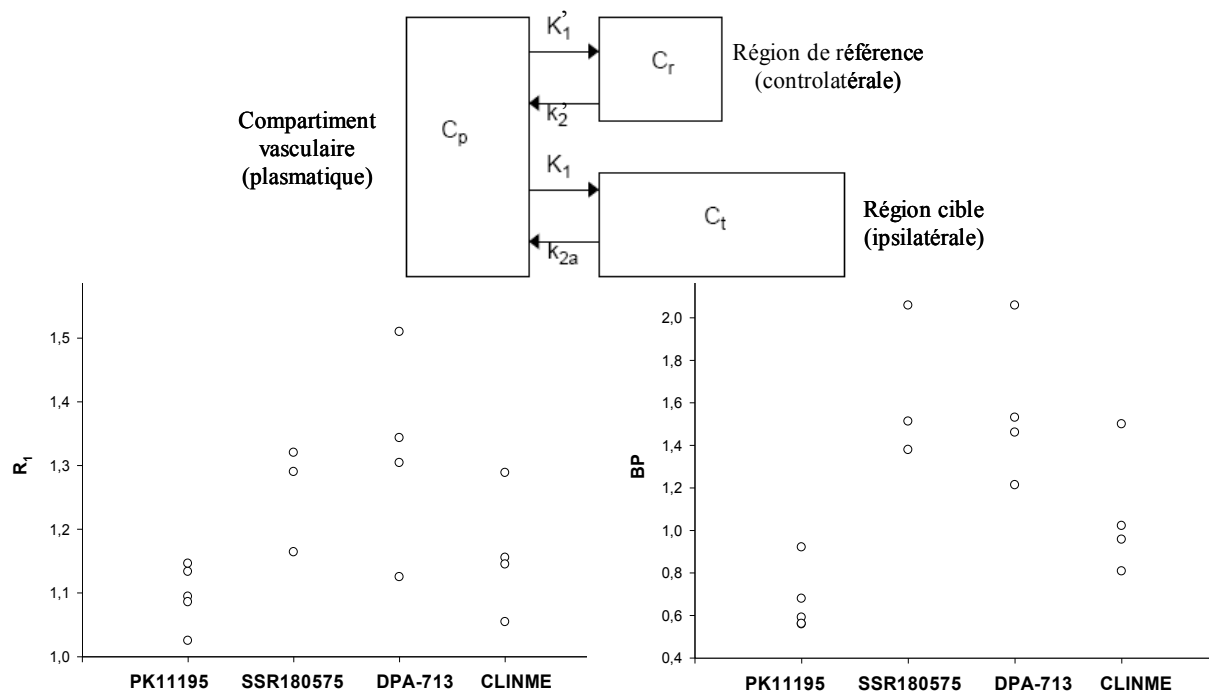


Figure 7. Paramètres individuels R_1 (gauche) et BP (droite) issus de la modélisation des données d'imagerie selon le modèle simplifié avec région de référence (en haut), définie ici comme la ROI « contro ».

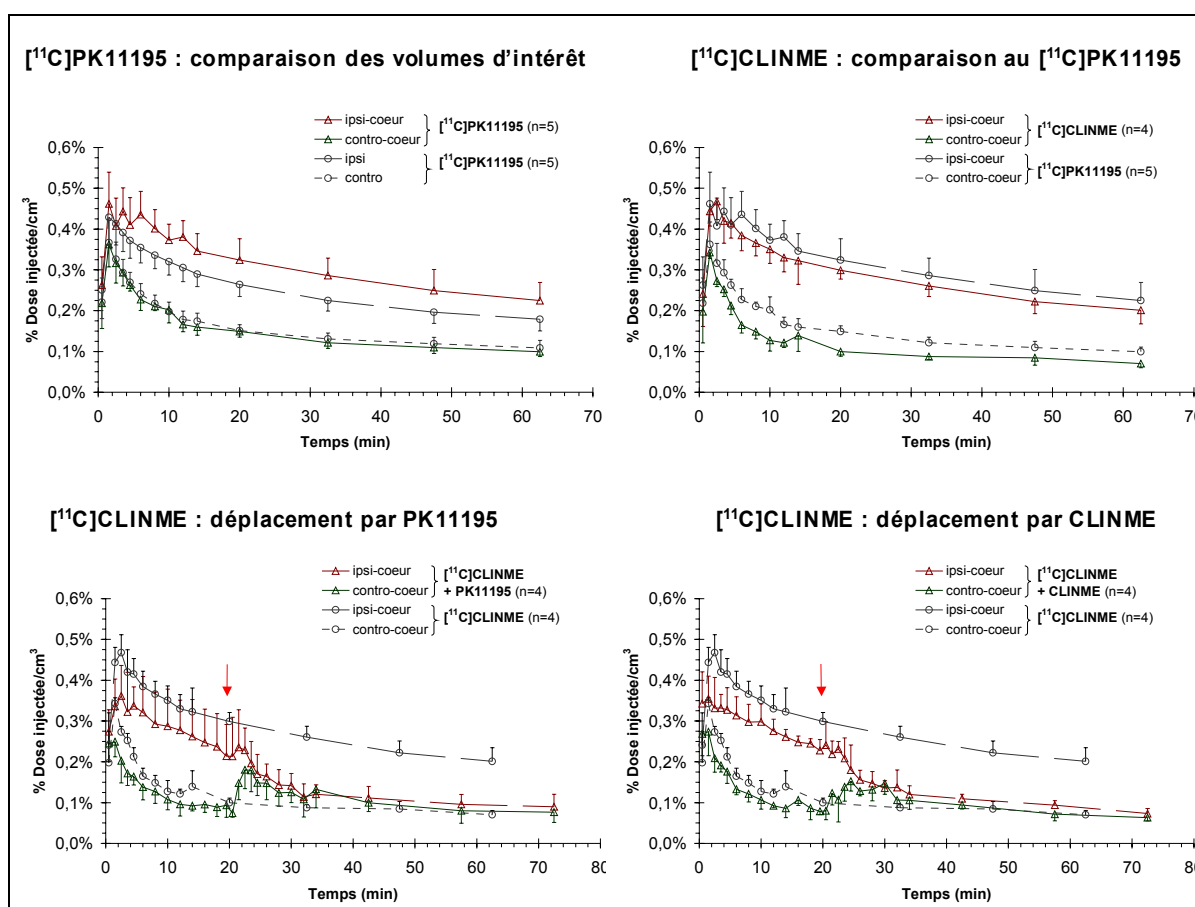
Données additionnelles

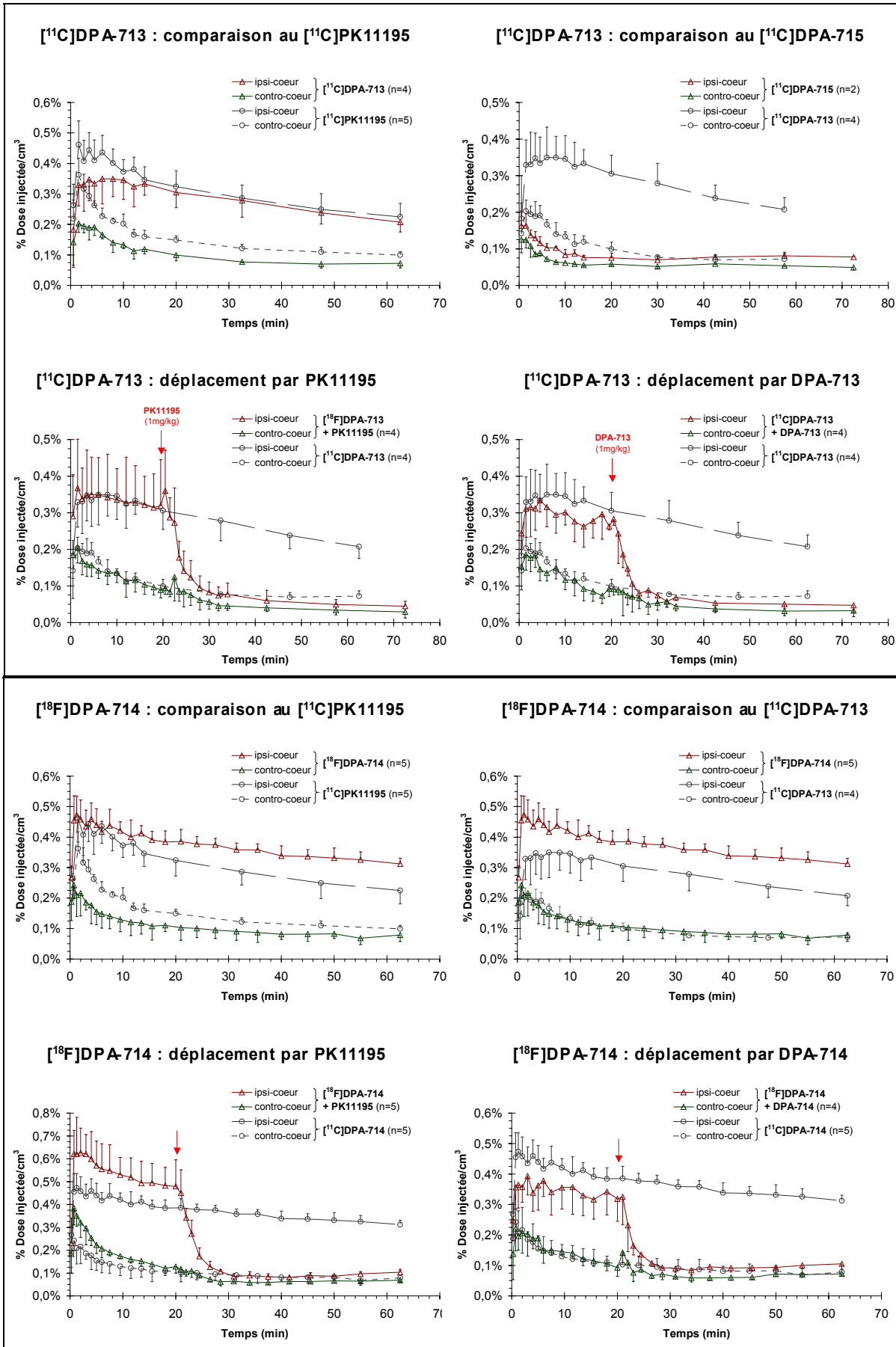
Des critiques évidentes à l'encontre de la quantification sur l'ensemble de la lésion tiennent à la variabilité du modèle lésionnel (taille de la lésion dessinée en TEP de 30 à plus de 150 mm³) et à la définition manuelle des ROI, 2 facteurs susceptibles d'introduire un biais important entre des groupes d'animaux de très faible effectif. Ces effectifs sont justifiés par le coût d'une radiosynthèse, qui dans le cas du marquage au carbone 11, est dédiée à l'imagerie d'un seul animal du fait de décroissance rapide du radioisotope. De plus, cette étude se veut un criblage efficace et rapide de nouveaux radioligands du PBR, donc doit, par essence, mettre en jeu un minimum d'animaux.

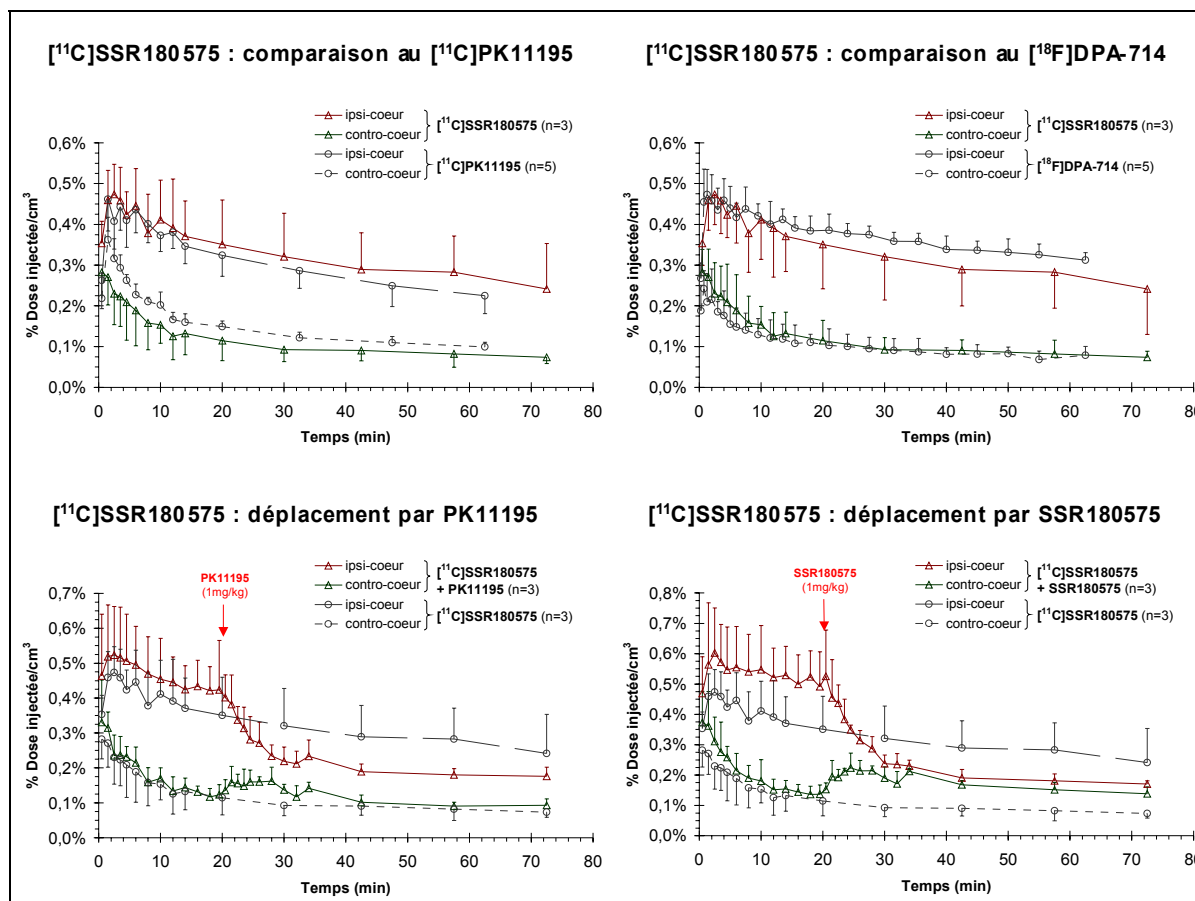
En l'absence de recalage avec une méthode d'imagerie anatomique (IRM), le choix de quantifier le signal émanant de l'ensemble de la lésion se justifie par la volonté de modéliser les courbes temps-activité obtenues, car ce sujet est un point sensible pour la dissémination clinique d'un radiotracer, et a, dans le cas du [¹¹C]PK11195, fait l'objet de controverses (24, 25). La sensibilité réduite des caméras dédiées au petit animal par rapport aux caméras cliniques, et la petite taille des structures observées imposaient d'utiliser tout le signal disponible pour éviter d'obtenir des courbes bruitées, qui rendent la modélisation peu fiable.

Néanmoins, pour éviter tout biais, et comparer entre eux les radioligands évalués sur la base d'une analyse quantitative identique, nous avons parallèlement dessiné des ROI de volume constant, placées au « coeur » de la lésion, mais de plus petite taille que celle-ci (ROI « ipsi-cœur » et « contro-cœur », 10 mm³). Ces ROI ont l'avantage de ne pas être sensibles à l'effet de volume partiel, qui fait apparaître en TEP une lésion plus volumineuse qu'elle ne l'est, et en sous-estime le signal. En revanche, la variabilité des mesures est légèrement augmentée par le plus petit nombre de détections en coïncidence associé à ce plus faible volume.

L'ensemble des courbes temps-activité générées ainsi est représenté ci-dessous, pour les 5 radioligands marqués au carbone 11, ainsi que pour le [^{18}F]DPA-714. La comparaison des courbes générées selon les 2 couples de ROI dans le cas du [^{11}C]PK11195 est visible sur le premier graphique. Le niveau de fixation hors de la lésion n'est que peu ou pas affecté, alors que la fixation dans la lésion est augmentée d'un facteur 1,2 à 1,3. La comparaison des courbes temps-activité de chacun des ligands avec celles du [^{11}C]PK11195 montre que ce biais lié au dessin de la ROI est systématique et ne remet pas en cause les conclusions déjà tirées sur la valeurs de ces ligands.







Le radiotracteur [¹⁸F]DPA-714 se comporte de manière similaire au [¹¹C]SSR180575. Sa liaison non spécifique est sensiblement diminuée par rapport à celle du [¹¹C]PK11195, au niveau de celle du [¹¹C]DPA-713, et sa rétention dans la lésion est augmentée. Un métabolite plasmatique est formé (représentant respectivement 25, 63 et 86% de la radioactivité détectée à 20, 40 et 60 min), mais seule la forme intacte est détectée dans le cerveau jusqu'à 60 minutes.

En conséquence, le contraste obtenu avec ce ligand, exprimé comme le rapport de la rétention dans la lésion (ipsi-coeur) sur la rétention hors de la lésion (contro-coeur) et représenté figure 8, dépasse celui des autres radiotraceurs, et ce dès les premières minutes. Pour l'ensemble des ligands, la valeur maximale de ce rapport ipsi-coeur/contro-coeur est atteinte après 20 minutes et ne varie pas significativement ensuite. En l'absence de modélisation du signal issu de ces ROI « ipsi-coeur » et « contro-coeur », le rapport moyen calculé à partir de 20 minutes constitue un index quantitatif du contraste obtenu avec un ligand donné (fig. 9).

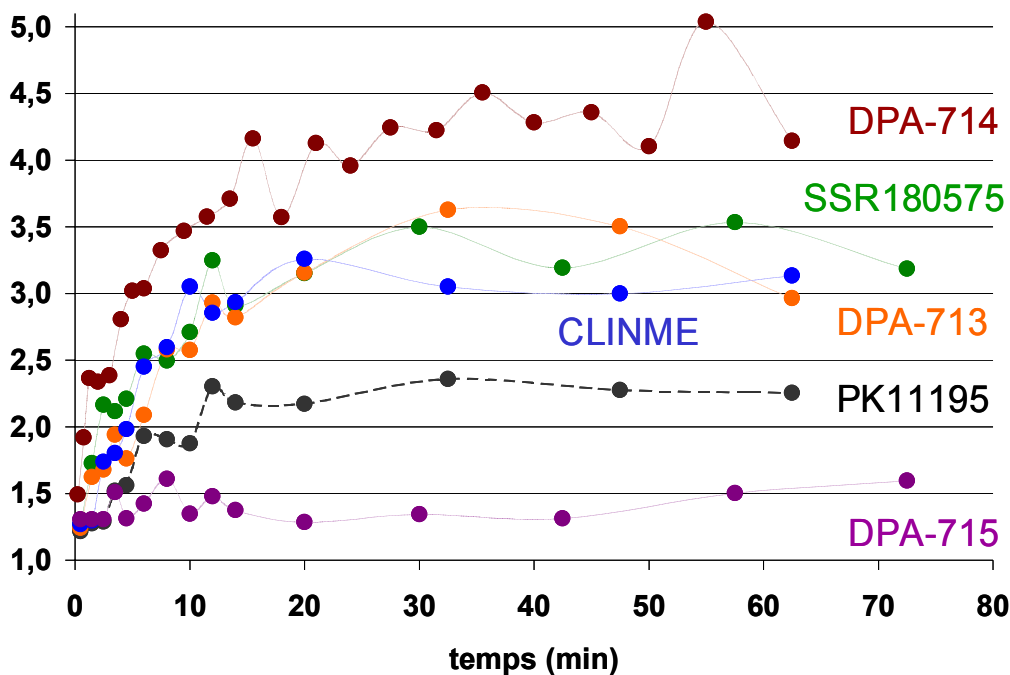


Figure 8. Evolution du rapport moyen ipsi-coeur/contro-coeur au cours du temps pour chacun des radioligands. Les écart-types (0,5 en moyenne) ne sont pas représentés par souci de lisibilité.

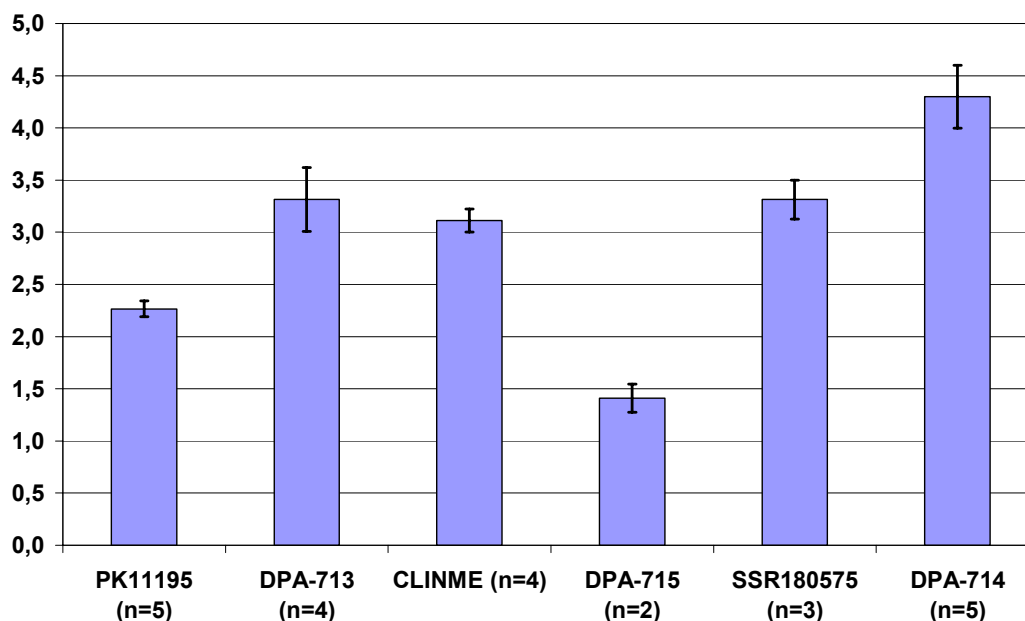


Figure 9. Rapport moyen ipsi-coeur/contro-coeur entre 20 et 70 min pour chacun des radioligands.

Le modèle de neuroinflammation aiguë, créé par une lésion striatale excitotoxique, a permis d'évaluer 5 nouveaux radiotraceurs ciblant le PBR, comparativement à la molécule de référence. 4 radiotraceurs sont supérieurs à celle-ci, indépendamment du mode de définition des régions d'intérêt.

2) Modèle de neuroinflammation chronique

L'intérêt actuel pour l'imagerie de la neuroinflammation tient à la mise en évidence de processus inflammatoires récurrents dans des pathologies, *a priori* non inflammatoires, mais classées comme neurodégénératives. Une activation microgliale précoce et durable est soupçonnée d'influer sur l'évolution de ces pathologies. Par conséquent, le radiotracer PBR idéal doit fournir une grande sensibilité de détection, ce qui est l'un des reproches majeurs adressés au [¹¹C]PK11195. Nous avons, dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire industriel, évalué comparativement au [¹¹C]PK11195, le [¹¹C]SSR180575 dans un modèle murin déjà largement caractérisé de la maladie d'Alzheimer, à composante neuroinflammatoire chronique.

2-1) Description

Le modèle s'appuie sur l'expression transgénique de la protéine humaine préséniline 1 mutée (PS1M146L) sous le contrôle du promoteur HMG-CoA reductase, et sur l'expression du fragment humain APP751 portant les mutations dites « suédoise » (KM670/671NL) et « de Londres » (V717I), noté APP₇₅₁SL, sous la dépendance du promoteur Thy1, sur un fond génétique murin hybride CBAx57Bl6 (26-29). Ces mutations ont été identifiées dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Les promoteurs assurent une expression des transgènes essentiellement neuronale, et la séquence consensus Kozack a été ajoutée au site d'initiation de la traduction du fragment APP. Sa forte expression conduit à la formation des dépôts β -amyloïdes extracellulaires caractéristiques de la pathologie.

Le croisement PS1M146LxAPP751SL (APPxPS1) permet d'accélérer le métabolisme APP et l'accumulation de peptide β -amyloïde (A β) (déteçté en western-blot dès 2 à 4 mois, en immunohistochimie ou coloration au rouge Congo dès 2,5 mois) (30). Les plaques se développent de manière reproductible d'abord dans le subiculum et dans la portion dorsale des neurones CA1 de l'hippocampe, puis gagnent le cortex entorhinal avant d'envahir le reste de l'hippocampe et des aires corticales. Elles sont largement distribuées dès l'âge de 6 mois, mais la charge globale continue de croître jusqu'à 12 mois, par augmentation de la taille des plaques individuelles. Le striatum et les noyaux thalamiques peuvent être atteints à un âge avancé, alors que le cervelet est épargné. La perte neuronale est faible et tardive (estimée à 25% à 17 mois dans la couche de cellules pyramidales de l'hippocampe), et l'atrophie est notable seulement au niveau du mésencéphale (31), mais des neurites dystrophiques sont observés (ubiquitin, synaptophysin, tau) en association avec des marqueurs de stress neuronal (CytC, Bax, MnSOD), et les fibres cortico-corticales sont désorganisées (32). La réaction astrocytaire et microgliale est principalement associée aux plaques, évidente à 17 mois mais non déteçtée dans l'hippocampe à 4,5 mois (33).

La réaction gliale dans le cerveau des souris APP/PS1 a été vérifiée en immunohistochimie par triple marquage neuronal, astrocytaire et microgliale sur des souris âgées de 20 à 23 mois (Fig. 9). Les souris PS1 d'une même portée, qui ne montrent pas d'accumulation A β , sont utilisées comme contrôle.

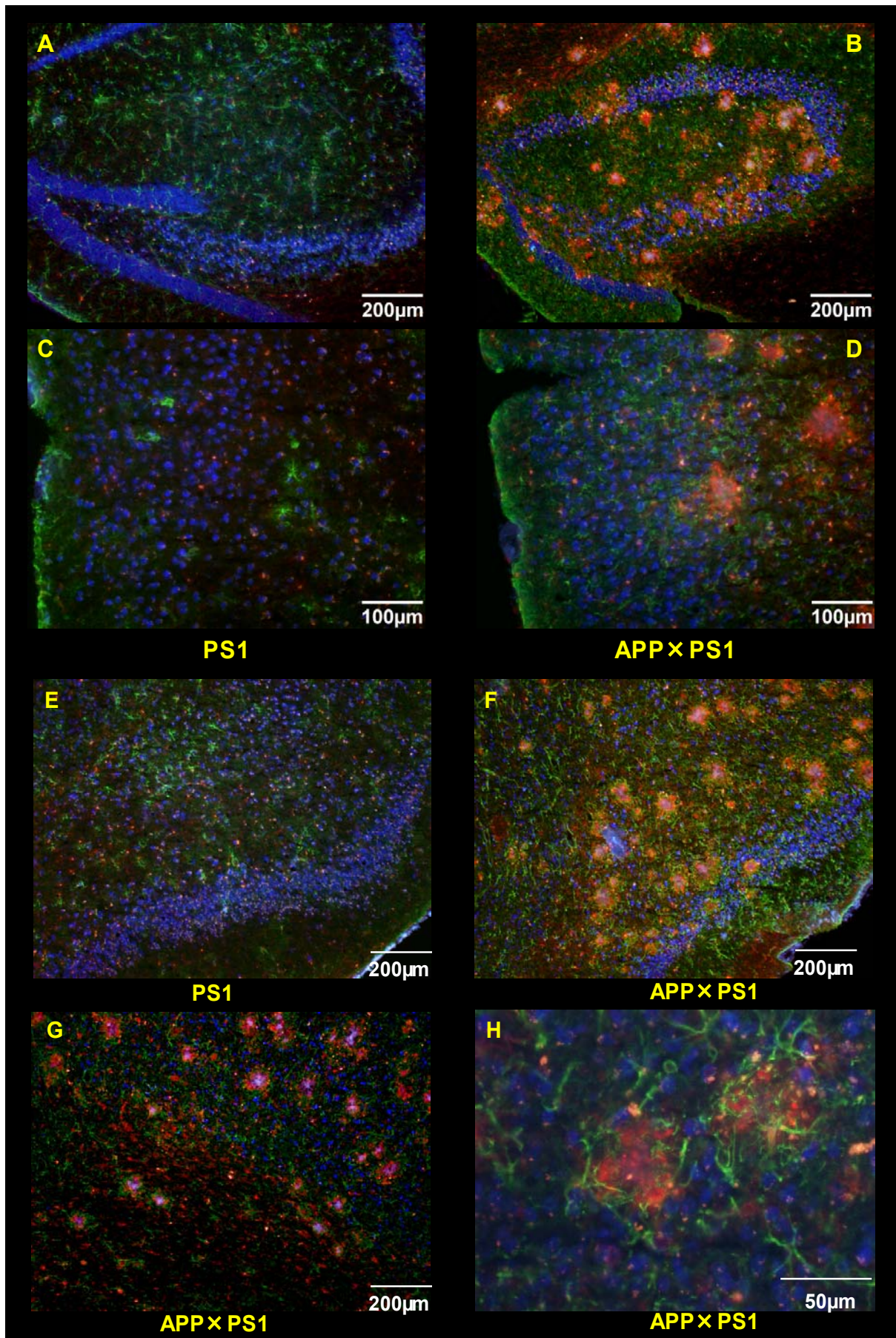


Figure 9. Immunohistochimie sur cerveaux de souris transgéniques PS1 (A,C,E) et APPxPS1 (B,D,F,G,H) au niveau de l'hippocampe (A,B), du cortex frontopariétal (C,D), piriforme (E,F), et du corps calleux (G). Les neurones (NeuN), astrocytes réactifs (GFAP), et cellules microgliales activées (CD11b) apparaissent respectivement en bleu, vert et rouge.

Les plaques sont repérées indirectement par l'activation gliale qui leur est associée. Nous avons ainsi confirmé leur distribution étendue depuis l'hippocampe (Fig. 9B) jusqu'aux aires corticales (Fig. 9D,F), accompagnée d'une intense réaction astro- et microgliale, mais sans perte neuronale flagrante. En l'absence de dépôts amyloïdes, seuls quelques astrocytes réactifs sont détectés dans les zones correspondantes chez les souris PS1 (Fig. 9A,C,E). Le corps calleux délimite l'aggrégation amyloïde (Fig. 9G), et peu de plaques sont détectées dans le striatum ou le thalamus. Un grossissement élevé (Fig. 9H, X60) révèle un cluster de cellules microgliales associé au coeur de la plaque, qui est entourée par les prolongements astrocytaires.

2-2) Résultats préliminaires

Le tableau 4 récapitule les données relatives aux injections des radiotraceurs.

| RADIOTRACEUR | Souris (n) | Activité injectée (mCi) (MBq) | RAS à l'injection (mCi/μmol) (GBq/μmol) | Quantité injectée (nmol) |
|----------------------------------|-------------------|--|--|-----------------------------|
| [¹¹C]SSR180575 | APP/PS1 (n=4) | 1,0 ± 0,1 37 ± 5 | 1130 ± 760 42 ± 28 | 1,1 ± 0,4 |
| | PS1 (n=4) | 1,0 ± 0,2 36 ± 7 | 1200 ± 320 45 ± 12 | 0,8 ± 0,1 |
| [¹¹C]PK11195 | APP/PS1 (n=4) | 0,5 ± 0,1 17 ± 6 | 680 ± 230 25 ± 9 | 0,8 ± 0,5 |
| | PS1 (n=3) | 0,4 ± 0,0 15 ± 1 | 800 ± 130 30 ± 5 | 0,5 ± 0,1 |

Tableau 4. Quantités de radioligands injectées (RAS = RadioActivité Spécifique). Toutes les injections ont été réalisées en i.v. (veine caudale).

Les doses injectées de [¹¹C]SSR180575 sont significativement plus élevées que celle de [¹¹C]PK11195, mais les quantités injectées ne diffèrent pas significativement d'un groupe à l'autre.

Les résultats de l'imagerie TEP sont insérés sous la forme suivante :

❖ [¹¹C]SSR180575 : extrait du rapport au partenaire industriel

F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, C. Thominaux, Hantraye, P., Dolle, F., Tavitian, B. and J. Benavides (2007) Report on radiolabeling of SSR180575 and animal PET imaging.



REPORT ON RADIOLABELING OF SSR180575 AND PET IMAGING

PART TWO: CHRONIC NEUROINFLAMMATION MODEL

(Ces résultats sont la propriété de Sanofi-Aventis.)

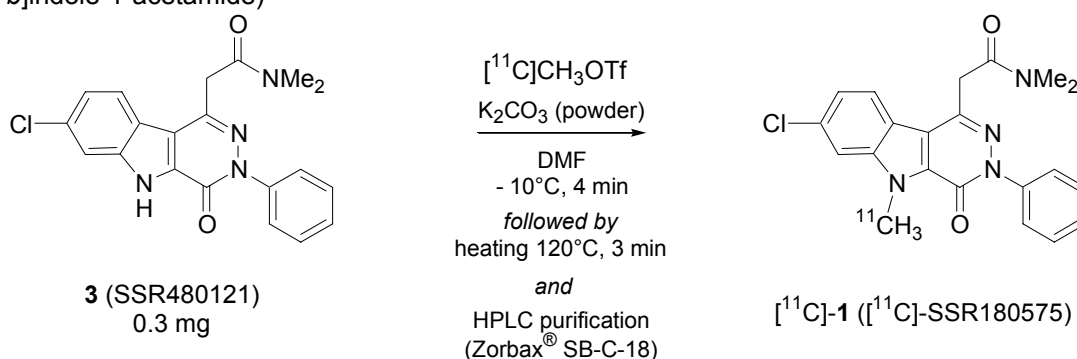
METHODS

Radiosynthesis of ligands

[¹¹C]-(*R*)-PK11195

((*R*)-*N*-Methyl-*N*-(1-methylpropyl)-1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxamide) was labelled with carbon-11 at its amide moiety from the corresponding *nor*-derivative ((*R*)-*N*-(1-methylpropyl)-1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxamide) using [¹¹C]methyl iodide (Both *nor*-(*R*)-PK11195 and PK11195 were kindly provided by Sanofi-Aventis). Typically, about 4.80 GBq of (*R*)-[¹¹C]PK11195 (> 98% radiochemically pure) was routinely obtained within 25 minutes of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation) with specific radioactivities ranging from 75 to 90 GBq/μmol.

[¹¹C]SSR180575 (7-Chloro-*N,N*,5-[¹¹C]trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide)



Synthesis : SSR180575 (**1**) was isotopically labelled with carbon-11 ($T_{1/2}$: 20.38 min) at its methyl indole moiety from the corresponding *nor*-analogue (**3**) using [¹¹C]methyl triflate and the following experimental conditions : (i) trapping at -10°C of [¹¹C]methyl triflate in DMF (300 μL) containing 0.2 to 0.3 mg of the precursor for labelling and 4 mg of powdered potassium carbonate (excess) ; (ii) heating at 120°C for 3 minutes ; (iii) taking-up the mixture with 0.5 mL of the HPLC mobile phase and (iv) purification using semi-preparative HPLC (Zorbax[®] SB-C-18)



; eluant : 0.9% aq. NaCl / EtOH / 1M aq. phosphate buffer (pH 2,3) : 50 / 50 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 6 mL/min ; Rt : 8.0-8.5 minutes). Typically, starting from a 1.5 Ci (55.5 GBq) [¹¹C]CO₂ production batch, > 100 mCi (> 3.7 GBq) of [¹¹C]SSR180575 were obtained within a total synthesis time of 20-25 minutes (HPLC-purification included). Specific radioactivities ranged from 1.43 to 1.95 Ci/μmol (52.9-72.2 GBq/μmol) at the end of radiosynthesis.

Formulation : The HPLC-solution containing pure [¹¹C]SSR180575 was diluted with aq. 0.9% NaCl (physiological saline) to an ethanol concentration below 10%

Quality Control : The radiotracer preparation was a clear and colourless solution with a measured pH between 5 and 7. As demonstrated by analytical HPLC* analysis, the radiotracer preparation was found to be > 95% chemically and radiochemically pure (*t_R* : 2.38 min). The preparation was shown to be free of non-radioactive precursor and was chemically and radiochemically stable for at least 60 minutes.

* Equipment : Waters Alliance 2690 equipped with a UV spectrophotometer (Photodiode Array Detector, Waters 996) and a Berthold LB509 radioactivity detector ; column : analytical Symmetry-M[®] C-18, Waters (50 x 4.6 mm) ; porosity : 5 μm ; conditions : eluent : solvA/solvB : 40/60 (v/v) [solvA : H₂O containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (% by weight : methanol (18-22%), heptane sulfonic acid-sodium salts (4-6%), phosphate buffer solution (3-7%), water (65-75%), pH 3, Waters), 20 mL for 1000 mL ; solvB : H₂O/CH₃CN : 30/70 (v/v) containing Low-UV PIC[®] B7 reagent (Waters), 20 mL for 1000 mL] ; flow rate : 2.0 mL/min ; temperature : 30°C ; UV detection at λ : 253 nm.

Transgenic mice

Generation and characterization of single PS1M146L (PS1) and double APP751SL×PS1M146L (APP×PS1) transgenic mice were described previously. In these animals, APP is expressed at a high level in all cortical neurons under the control of the Thy-1 promoter. Human PS1 with the M146L mutation is expressed under the control of the HMG-CoA reductase promoter. The level of amyloid load was found to be quite reproducible at a given age; the coefficient of error between animals is below 10%. Both single PS1 and double APP×PS1 mice, provided by Sanofi-Aventis, were used for PET imaging at the age of 11-12 months.

MicroPET scans and data acquisition

Anaesthesia was induced by isoflurane 5%, and thereafter maintained by 2-2.5% of isoflurane in a mixture 70%/30% NO₂/O₂. Mice were set on a bed equipped with an anaesthetic mask allowing heating of the air flowed. Imaging protocols were conducted with a Concorde Focus 220 PET scanner using either [¹¹C]PK11195 or [¹¹C]SSR180575.

In mice, radiolabelled compounds were injected in the caudal vein using 28 gauge needles immediately before PET scan initiation. PET data were acquired for 60min. Dose injected, number of animals, body weight, dose injected and specific radioactivity were as follows:

- [¹¹C]PK11195 : (PS1, n=4) 13.0-16.1MBq, 0.41-0.58nmoles
(APP×PS1, n=4) 12.9-25.2MBq, 0.57-1.47nmoles
- [¹¹C] SSR180575 : (PS1, n=3) 28.6-41.1MBq, 0.69-0.94nmoles
(APP×PS1, n=4) 30.6-43.0MBq, 0.52-1.24nmoles

The PET acquisition was conducted with the time coincidence window set to 6ns and the levels of energy discrimination set to 350keV and 750keV. The list mode acquisition data files were histogrammed into 3D sinograms with a maximum ring difference of 47 and span 3. The list mode data of the emission scans were sorted into dynamic frames. The attenuation

correction factors were measured using an external ^{68}Ge point source. Finally, the emission sinograms (each frame) were normalized, corrected for attenuation and radioactivity decay, and reconstructed using FORE and OSEM 2D (16 subsets and 4 iterations).



Image analysis

PET image analysis was performed using ASIPro VM™ (CTI Concorde Microsystems' Analysis Tools and System Setup/Diagnostics Tool). Whole brain was delineated on coronal slices.

Autoradiography

^{11}C SSR180575 autoradiography was performed using 20 μm brain sections of mice (20-23 months). Non-specific binding was assessed using an excess of either unlabelled PK11195 or SSR180575. Specificity for PBR vs central benzodiazepine binding sites was checked using an excess of unlabelled flumazenil. Sections were incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, adjusted at pH7.4 at 4°C, 50 mM with NaCl 120 mM), then rinsed 2 times for 2 min with cold buffer, followed by a quick wash in cold distilled water. Sections were then placed in direct contact with a Phosphor-Imager screen and exposed overnight; autoradiograms were analysed using ImageQuant™ software.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD. Comparisons were performed using Mann-Whitney non-parametric test for PET data, and using ANOVA followed by a Bonferroni's test for autoradiographic data. For all statistical analyses, the significance level was $p < 0.05$.

RESULTS

In both PS1 and APP \times PS1 living mice, ^{11}C SSR180575 uptake from the whole brain (cerebellum excluded) is higher than the corresponding uptake of ^{11}C PK11195 (Figure 1). But the difference between PS1 and APP \times PS1 mice uptakes is not significant using ^{11}C PK11195, nor ^{11}C SSR180575.

In contrast, specific binding is demonstrated in vitro (Figure 2). Whole section staining of APP \times PS1 mice is approximately twice that of PS1 mice, and equal, strongly reduced staining is observed with an excess of PK11195 or SSR180575.

CONCLUSION

Imaging the A β -induced mouse model of chronic neuroinflammation proved to be challenging, and specific binding demonstrated in vitro does not result in a clear difference in the in vivo uptake of radiotracers.

FIGURE 1

Time-activity curve for [¹¹C]SSR180575 and [¹¹C]PK11195 in 11/12 months-old mice

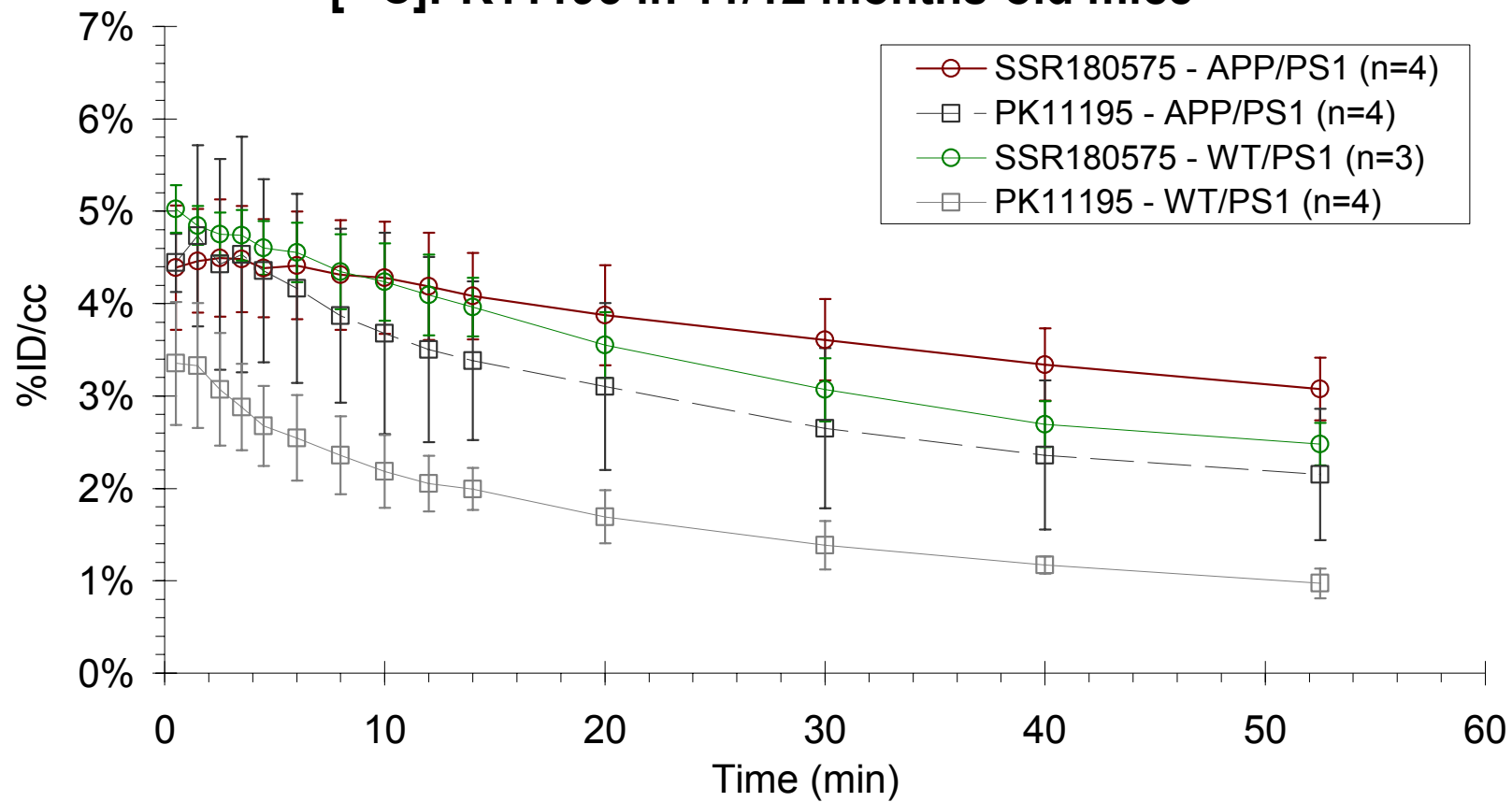
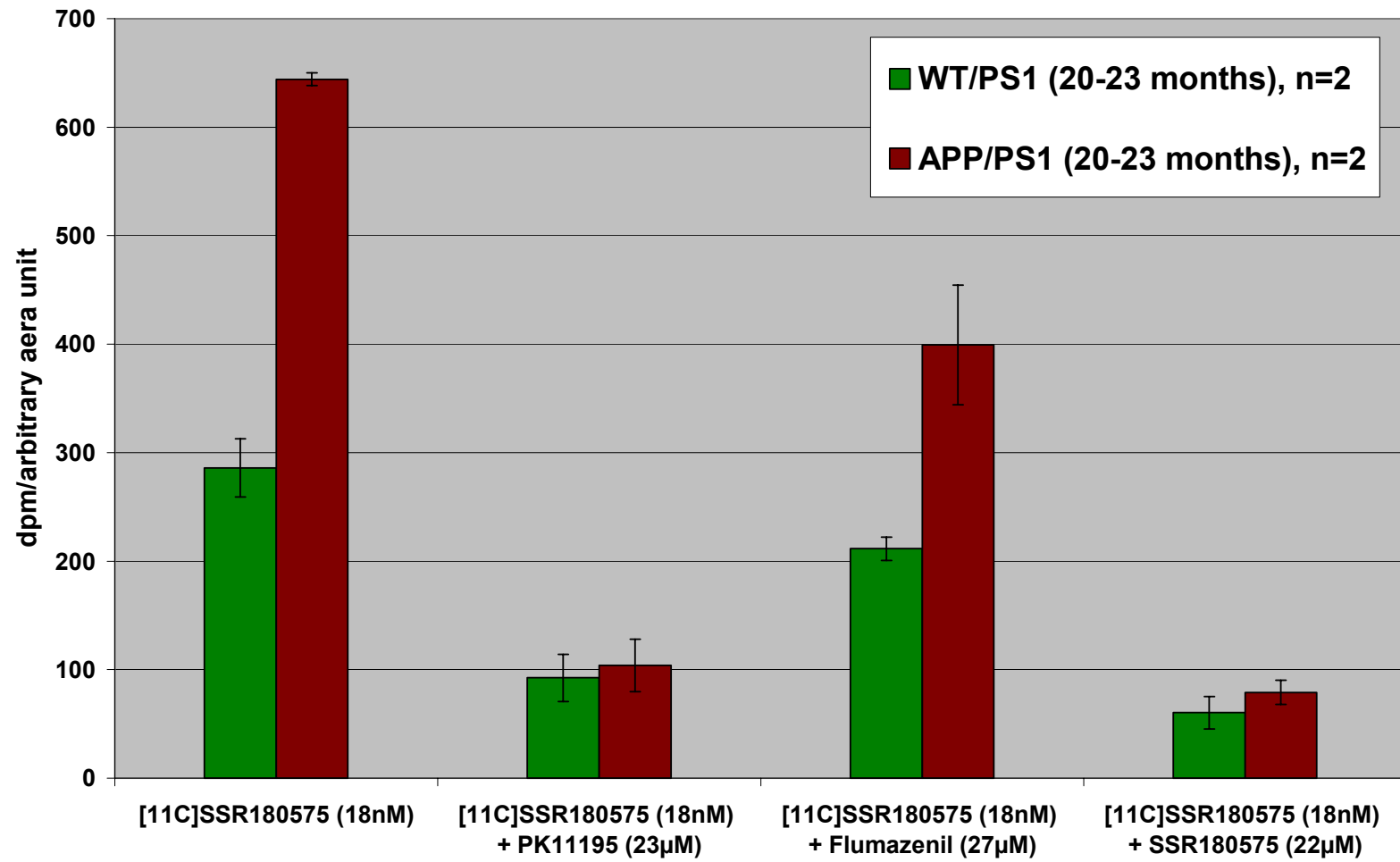




FIGURE 2





Résumé

L'autoradiographie menée sur 4 souris avec le [^{11}C]SSR180575 confirme l'existence de sites de liaison spécifiques (fig. 10), déplacés par le PK11195 ou le SSR180575, même si, de manière surprenante, un déplacement partiel du marquage par le flumazenil est observé. Un signal fort émane de l'ensemble des régions corticales chez les souris APP/PS1, et les distingue des souris PS1.

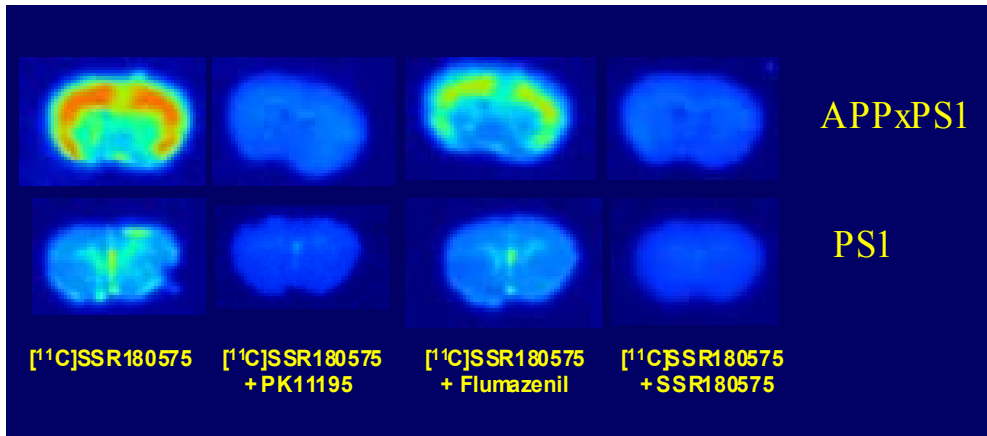


Figure 10. Autoradiographie [^{11}C]SSR180575 sur coupes coronales de souris transgéniques. Les conditions sont celles indiquées dans le tableau 2. La quantification est relative (échelle en dpm/unité d'aire, signal croissant du bleu au rouge).

Pourtant, en imagerie TEP, aucun des 2 radiotraceurs ne permet de différencier les souris APPxPS1 des souris PS1 sur la base d'une région d'intérêt englobant tout le cerveau, mais excluant le cervelet. En effet, celui-ci est fortement marqué chez les deux groupes de souris et ce, quelque soit le radiotraceur utilisé (fig. 11).

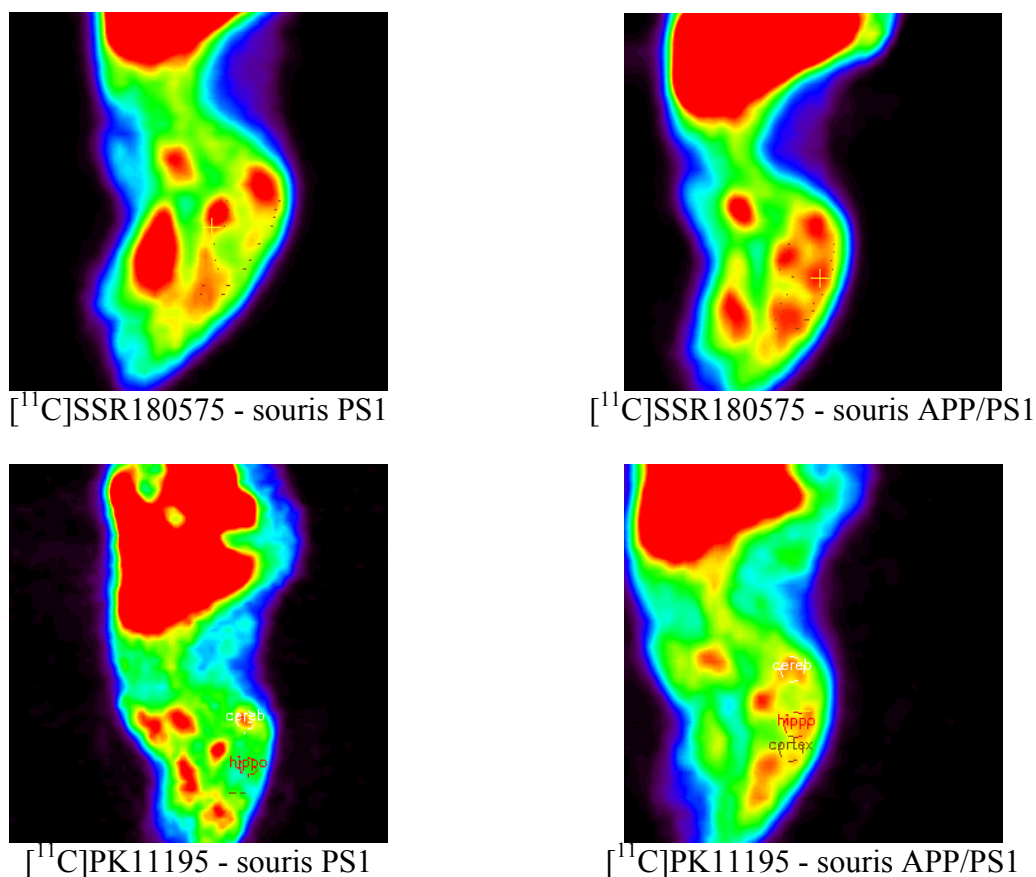


Figure 11. Images TEP des souris transgéniques obtenues avec $[^{11}\text{C}]\text{SSR180575}$ et le $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (images après 60 min d'acquisition ; coupe sagittale). La délimitation du cerveau entier est visible sur les images du haut, le dessin des ROI sphérique de volume constant est représenté sur les images du bas.

Données additionnelles

De manière similaire à ce qui a été fait chez le rat, et parce que la définition du cerveau sur la seule base de l'image TEP est délicate, une approche de quantification par ROI fixes a été menée en parallèle. Deux ROI sphériques de $6,5 \text{ mm}^3$ sont dessinées, l'une au niveau de la zone cérébelleuse fortement marquée (donc nommée « cervelet »), l'autre au niveau d'une zone assez marquée chez les souris APP/PS1, qui pourrait englober l'hippocampe et les zones corticales alentours (donc nommée « hippocampe » par facilité, sans évidemment prétendre assigner le signal de la ROI à une structure cérébrale si petite).

Les quantifications (fig. 12) montrent que, conformément à l'impression visuelle, l'écart entre les 2 groupes de souris est plus important dans la zone amyloïdogénique « hippocampe » que pour l'ensemble du cerveau. $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ fournit un contraste plus important que $[^{11}\text{C}]\text{SSR180575}$, mais la variabilité est plus grande. Dans le cervelet, les différences entre les souris APPxPS1 et PS1 sont moindres, mais la fixation dans cette région dénuée de plaques amyloïdes est du même ordre que pour l'hippocampe. Le calcul du rapport des rétentions du radioligand dans les 2 ROI (ratio « hippocampe / cervelet ») semble un index fiable pour la différenciation des animaux, puisque le $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ fournit une différence significative dès 12 min, et le $[^{11}\text{C}]\text{SSR180575}$ après 30 min.

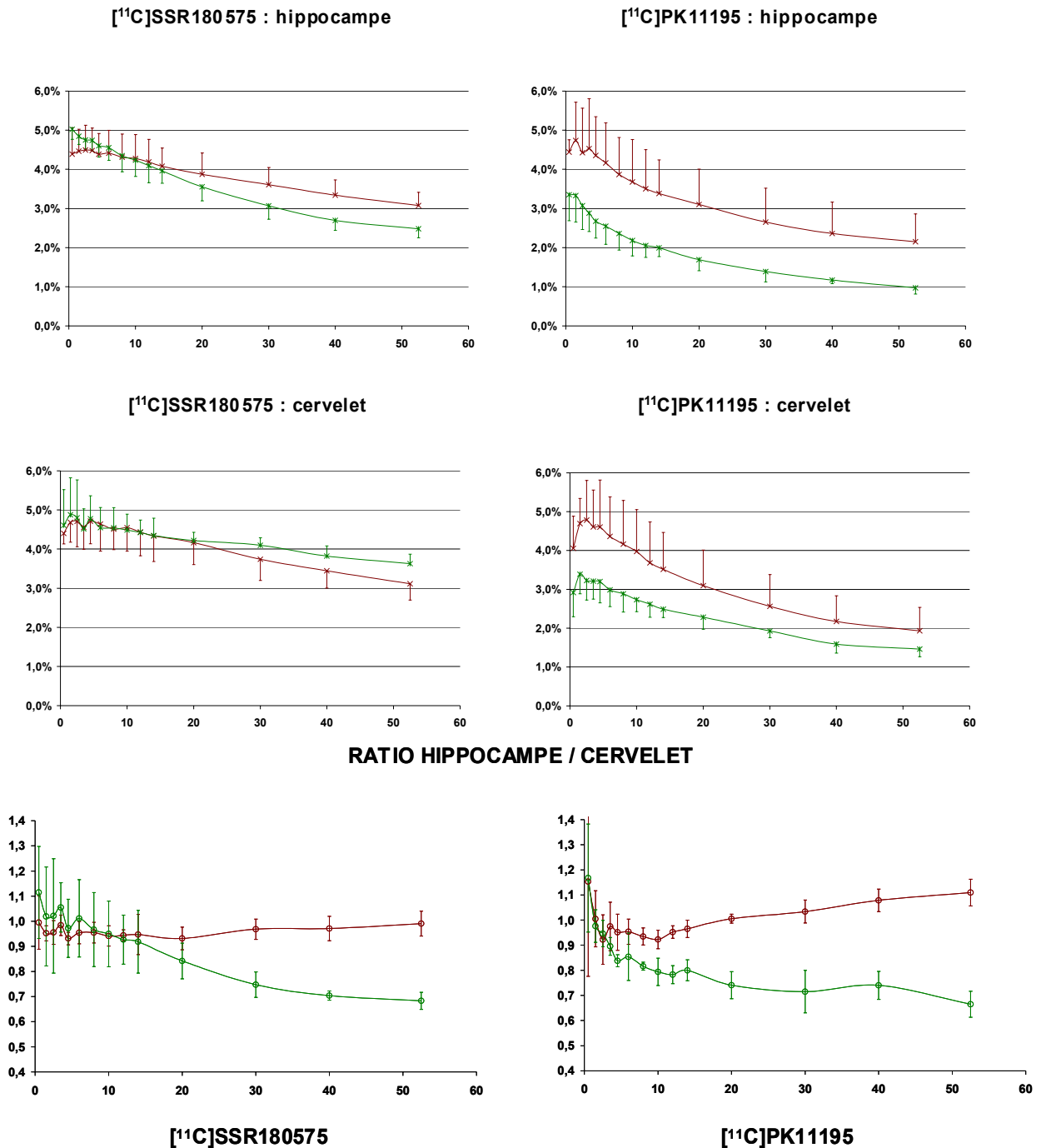


Figure 12. Courbes temps-activité générées à partir de ROI de taille fixe dénommées « hippocampe » et « cervelet » d'après leur localisation approximative, et ratio correspondants. Les courbes brunes correspondent aux souris APP/PS1, les courbes vertes aux souris PS1.

La neuroinflammation chronique, induite par les plaques amyloïdes, semble détectée de manière plus fiable avec le $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ qu'avec le $[^{11}\text{C}]\text{SSR180575}$. Cependant, la quantification est délicate à cause de la taille critique du cerveau, et de la présence d'un fort signal *a priori* non spécifique dans le cervelet.

3) Discussion sur l'évaluation préclinique de radioligands du récepteur périphérique aux benzodiazepines

Ce travail visait à évaluer dans des conditions proches de leur utilisation clinique potentielle, la capacité d'un certain nombre de radioligands du PBR à rendre compte de l'activation microgliale. Nous avons mené une étude complète mettant en jeu 5 radiotraceurs-candidats dans une condition neuroinflammatoire aiguë créée par une injection intrastriatale excitotoxique chez le rat. Le suivi longitudinal d'un modèle murin à composante neuroinflammatoire chronique a également été abordé. Etant donné le nombre élevé de ligands du PBR radiomarqués, et le peu d'information apporté par les études de biodistribution où l'expression du PBR dans le cerveau intact est minime, il s'agissait de proposer et de valider un modèle neuroinflammatoire et l'imagerie TEP correspondante comme méthode de criblage efficace pour la comparaison de ces molécules et la sélection rapide des plus prometteuses.

Modèle de neuroinflammation aiguë

Les résultats que nous avons publiés concernant le modèle AMPA (34, 35) sont les premiers associant l'imagerie TEP du petit animal, un modèle neuroinflammatoire, et la comparaison directe d'un radioligand du PBR au radiotraceur de référence, le [¹¹C]PK11195. Comme indiqué dans la partie A-4-2, Imaizumi *et al.* ont testé le potentiel du radioligand [¹¹C]PBR28 dans un modèle d'ischémie cérébrale, sans comparaison au [¹¹C]PK11195 (36). Maeda *et al.* ont mentionné l'imagerie d'un rat après une injection intrastriatale d'éthanol par le [¹⁸F]FEDAA1106 (37), un radioligand par ailleurs déjà évalué chez le sujet sain (38). Enfin très récemment, Venneti *et al.* ont comparé le [¹¹C]DAA1106 au [¹¹C]PK11195 sur des rats ayant reçu une injection striatale de LPS ou de 6-OHDA (15), ainsi que dans un modèle de traumatisme crânien (39), mais n'ont pas publié la quantification de l'imagerie cérébrale.

Peu d'études chez le petit animal ont inclus la détection de la neuroinflammation par TEP. Cicchetti *et al.* avait mesuré l'activation microgliale ([¹¹C]PK11195) et la perte dopaminergique ([¹¹C]CFT, radioligand du transporteur de la dopamine) consécutive à une lésion striatale au 6-OHDA (40). Les auteurs ont calculé un index de liaison en utilisant le cervelet comme référence, et ont confirmé l'augmentation de cet index dans le striatum (45±17%) et la substance noire (67±23%) par immunohistochimie. Le calcul du rapport ipsi/contro dans le modèle AMPA (1,6±0,05 en moyenne entre 10 et 70 minutes post-injection du [¹¹C]PK11195) indique une augmentation de la liaison dans le striatum lésé du même ordre de grandeur (60±5%).

Nous avons vérifié la spécificité de la liaison au PBR *in vivo* par des protocoles de déplacement par le (*R,S*)-PK11195. Pour autant, nous n'avons pas abordé la question de l'origine cellulaire du signal, souvent discutée dans la littérature. Selon l'étude mentionnée plus haut de Maeda *et al.* (37), l'injection intrastriatale d'éthanol produit une dynamique d'activation gliale similaire à la lésion excitotoxique à l'AMPA, et après 7 jours, les astrocytes réactifs en bordure de la lésion (dont le coeur est occupé par des macrophages/cellules microgliales) participent à l'augmentation de l'expression du PBR,

révélee par immunohistochimie. Les auteurs estiment que cette contribution est significative mais ne dépasse pas 30%, et décline à partir de 2 semaines. Une telle évolution temporelle des origines cellulaires de l'expression du PBR a déjà été rapportée, avec des dynamiques différentes selon les modèles (41). Pourtant, les études de microautoradiographie tendent à assigner aux cellules microgliales l'essentiel du marquage par le [³H]PK11195 (16) ou le [³H]DAA1106 (15). Une contribution astrocytaire au signal TEP observé est donc possible à 7 jours après l'injection d'AMPA, mais la différence de résolution importante entre les techniques immunohistochimique et autoradiographique utilisées ici ne nous permet pas de conclure sur ce point.

Considérant le comportement des 6 radioligands employés, il apparaît évident que la biodisponibilité cérébrale ne peut pas être prédite d'après les mesures *in vitro* de l'affinité et de lipophilicité. L'exemple du DPA-715 est frappant, puisque ce composé très proche du DPA-713 est beaucoup plus lipophile (logP 4,5 vs 2,4) et conserve une bonne affinité (16 vs 4,7 nM). Il est pourtant largement exclu du parenchyme cérébral, lésion y compris, alors que le DPA-713 manifeste une rétention similaire au PK11195. Les modèles de BHE *in vitro* peinent également à rendre compte des observations faites *in vivo* (42), et cela justifie totalement l'évaluation précoce en imagerie du petit animal des radiotraceurs-candidats.

Nos collaborateurs australiens ont évalué la biodistribution cérébrale des composés DPA chez le babouin. Les résultats (Fig. 13) montrent une cohérence globale entre espèces (singe vs rat) vis-à-vis de la biodisponibilité cérébrale.

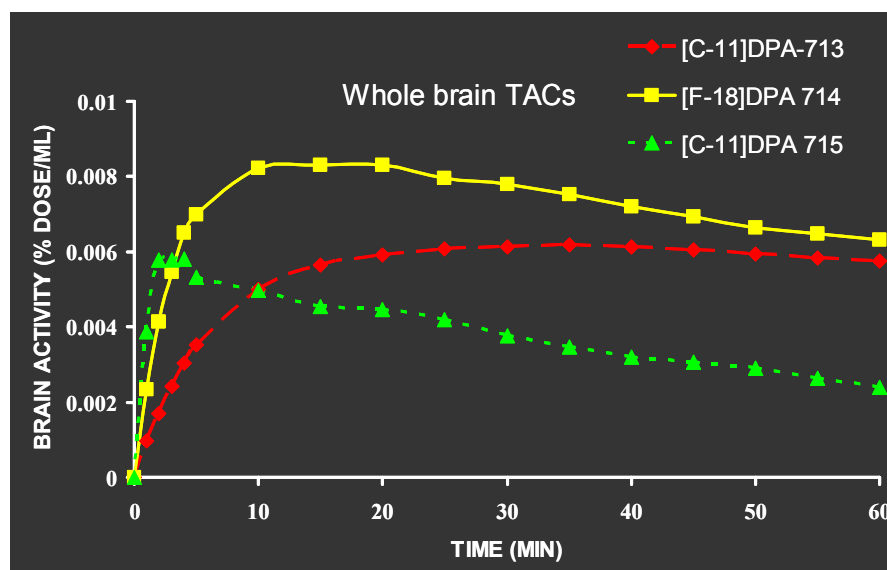


Figure 13. Courbes temps-activité pour l'ensemble du cerveau d'un babouin *Papio hamadryas*, obtenues avec les 3 radioligands du PBR [¹¹C]DPA-713, [¹⁸F]DPA-714 et [¹¹C]DPA-715 (M. Kassiou, Brain-Mind Research Institute, Sydney).

En effet, le [¹⁸F]DPA-714 est mieux extrait du compartiment sanguin que le [¹¹C]DPA-713, alors que le [¹¹C]DPA-715 est à un niveau beaucoup plus faible. Quant au [¹¹C]PK11195, passé un pic de distribution atteignant 0,008 % dose/ml, il est en fin d'examen, à un niveau intermédiaire entre ceux de DPA-715 et DPA-713 (0,004 à 0,005 % dose/ml) (43, 44).

Une différence majeure entre les 2 espèces concerne la phase de distribution, qui consiste pour le [¹¹C]DPA-713 et le [¹⁸F]DPA-714 en une lente accumulation chez le singe, et en un pic suivi d'une décroissance continue chez le rat. Une question légitime concerne le nombre de sites disponibles chez chaque espèce en relation avec les quantités injectées de chacun des ligands. A radioactivité spécifique égale, l'injection d'une dose traceuse (conduisant à l'occupation de 10% des sites de liaison spécifiques) est en général assurée chez

le babouin, mais difficile à vérifier chez le rat, à moins de mettre en oeuvre un protocole complet de modélisation avec multi-injections et prélèvements artériels pour accéder aux valeurs de K_d et B_{max} *in vivo*. Les ligands PBR ajoutent un degré de complexité supplémentaire puisque l'essentiel des sites de liaison spécifiques se situent en périphérie (glandes surrénales, reins, coeur, organes sexuels). Nous avons de fait observé une marge assez importante dans les quantités injectables pour le modèle AMPA. Les variations de radioactivité spécifiques – inter-radiosynthèse pour le carbone 11, ou liées à la décroissance plus lente du fluor 18, qui permet de réaliser l'imagerie de 4 à 5 rats à partir d'une radiosynthèse – montrent que l'injection de plusieurs nanomoles (jusqu'à 8-10 nmol) de radioligand ne perturbe pas le contraste obtenu ou les paramètres issus de la modélisation d'une manière plus importante que les variations inter-animales, strictement liées à la biologie du modèle.

Il nous semble donc que les quantités injectées n'influe pas notablement sur l'allure des courbes chez le rat. Les différences entre rat et singe peuvent être liées à des variations inter-espèces affectant le site de liaison, ou plus probablement les constantes de vitesse d'échange entre compartiments sanguin et tissulaire. Cependant, seule une modélisation complète des paramètres pharmacocinétiques, incluant une fonction d'entrée artérielle permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, et une telle approche serait certainement plus sensible aux variations de quantités injectées, que le modèle simplifié utilisé ici.

L'emploi de ce modèle simplifié avec région de référence se justifie par la difficulté de mettre en oeuvre un prélèvement artériel systématique à moins d'ajouter un groupe d'animaux dédié à l'obtention de cette fonction d'entrée. L'estimation d'une fonction d'entrée par une ROI cardiaque est proposée chez le petit animal (45), mais dans notre cas, le placement simultané dans le champ de vue de la caméra du coeur et du cerveau aurait conduit à dégrader fortement sur le plan de la résolution les régions d'intérêt (1,35 mm au centre ; 2,30 mm résol au bord). Cela engendrerait une imprécision supplémentaire sur la définition des ROI.

Le choix de la ROI « contro » comme référence pour la modélisation des paramètres de la ROI « ipsi » est bien sûr erroné au sens strict, puisque cette partie du cerveau n'est pas dénuée d'une expression basale de PBR. Elle est cependant logique au regard d'un modèle destiné à créer une inflammation focale importante, conduisant à la sur-expression de la cible moléculaire dans une structure unilatérale bien délimitée. Ce choix d'une région de référence controlatérale a déjà été décrit pour l'analyse de l'inflammation focale lié à un AVC chez l'homme (46). Le cervelet a également été utilisé dans un cas similaire (47). Le cervelet est plus vascularisé que les autres régions cérébrales et est susceptible de subir des changements métaboliques après un AVC (diaschisis). Les auteurs justifient ce choix par la mesure d'un BP augmenté dans certaines régions controlatérales connectées au site lésionnel. Dans notre cas, nous avons vérifié en autoradiographie, avec l'inclusion d'animaux non lésés, que la liaison des radioligands n'était pas augmentée du côté controlatérale.

Les performances comparées des ligands sur le modèle rat AMPA ne mettent pas en évidence une relation directe entre le contraste obtenu en autoradiographie *in vitro* et celui de l'imagerie TEP *in vivo*. [^{11}C]CLINME exhibe un ratio ipsi/contro inférieur à 2 *in vitro*, loin de la valeur du [^{11}C]DPA-713 (>6), pourtant *in vivo*, la différence entre ces deux ligands est

modeste ($2,1 \pm 0,1$ en moyenne entre 10 et 70 minutes post-injection pour [^{11}C]CLINME, contre $2,5 \pm 0,2$ pour [^{11}C]DPA-713 ; BP = $1,1 \pm 0,3$ vs $1,6 \pm 0,4$). Il est vraisemblable que les résultats de l'autoradiographie sont influencés par la vitesse à laquelle chaque ligand atteint l'équilibre. *In vivo*, tous montrent un pseudo-équilibre apparent après 20 minutes maximum, ce qui a justifié le choix de cette durée pour les expériences de déplacement et d'autoradiographie.

L'injection intraveineuse d'un excès de ligand non marqué met en jeu un déplacement séquentiel des sites périphériques puis cérébraux, avec une augmentation transitoire du taux plasmatique et cérébral en radioligand. Ce mécanisme a été invoqué pour expliquer l'absence de déplacement du [^{11}C]PK11195 dans le cerveau de singe lors d'un protocole de pré-traitement (43), et il conduit sur le modèle AMPA à une augmentation transitoire et réversible de la rétention, notamment dans la région non lésée. L'ampleur de cette augmentation et surtout la vitesse à laquelle le niveau basal est recouvert varie fortement selon les radioligands (3 à 5 minutes pour [^{11}C]DPA-713 et [^{18}F]DPA-714, mais 10 à 15 minutes pour le [^{11}C]CLINME et le [^{11}C]SSR180575). Cette durée plus ou moins longue pourrait refléter la vitesse plus ou moins grande à laquelle l'équilibre est atteint en autoradiographie, où les 2 composés DPA manifestent le contraste le plus important.

Néanmoins, la spécificité envers un site de liaison au PBR partagée par le [^{11}C]PK11195 et les autres radioligands évalués a été démontrée en autoradiographie et confirmée *in vivo*, excepté le cas du [^{11}C]DPA-715 fournissant un contraste insuffisant. Le cas du [^{11}C]SSR180575 pose question, dans la mesure où le déplacement par le PK11195 semble incomplet, et le déplacement par le ligand lui-même semble conduire à une augmentation de la liaison controlatérale. Comme les résultats *in vitro* suggèrent une identité du site de liaison à celui du PK11195, le comportement observé *in vivo* pourrait confirmer le caractère irréversible de la liaison du SSR180575, déjà décrit par Vin *et al.* (5). La confirmation de cette hypothèse requiert des protocoles d'imagerie avec pré-traitement par le PK11195 et le SSR180575, qui devraient abolir totalement le contraste entre les régions « ipsi » et « contro ».

La présence d'un site additionnel lié ou non à l'expression basale du PBR est suggéré *in vitro* pour les radioligands [^{11}C]DPA-713 et [^{11}C]CLINME, mais n'a pas été mise en évidence *in vivo* : soit ceci est un artefact lié à la technique autoradiographique, soit ce site additionnel putatif est en trop faible quantité pour être détecté *in vivo*, de même qu'une liaison spécifique du côté controlatéral est observée *in vitro* mais pas *in vivo*. La possibilité de sites de liaison multiples ou partiellement différents de celui du PK11195 a aussi été notée dans le cas du [^{11}C]DAA1106 (15, 44), où les expériences de pré-traitement/déplacement par le PK11195 ou le DAA1106 conduisent à des résultats très différents.

L'imagerie TEP montre que 3 à 4 des radioligands évalués ([^{11}C]DPA-713, [^{11}C]CLINME, [^{18}F]DPA-714, et probablement [^{11}C]SSR180575) montrent une rétention inférieure à celle du [^{11}C]PK11195 dans le striatum non lésé, et 1 à 2 ([^{18}F]DPA-714, et probablement [^{11}C]SSR180575) montrent une rétention plus élevée dans le striatum lésé. Le manque de sensibilité du [^{11}C]PK11195 étant à la fois attribué à un fort signal non-spécifique et à une faible biodisponibilité, [^{18}F]DPA-714 et [^{11}C]SSR180575 apparaissent comme les 2 radiotraceurs les plus prometteurs selon ce modèle, en réalisant le meilleur compromis entre biodisponibilité augmenté et signal basal (non spécifique) réduit.

Toutefois, ces interprétations reposent sur le fait que, parallèlement à la situation *in vitro*, la courbe « ipsi » reflète la liaison totale du ligand à sa cible, et la courbe « contro » sa liaison non spécifique. Passée la phase de distribution du radioligand dans l'organisme, un équilibre apparent est atteint et ces 2 courbes évoluent parallèlement. L'étude des déplacements et la modélisation des courbes est en accord cette interprétation. Pourtant en l'absence de protocole de pré-traitement (injection d'un excès de ligand avant celle du radiotraceur), et de modèle compartimental validé (le modèle simplifié avec région de référence a été choisi *a priori*), on ne peut que supposer la réalité du pseudo-équilibre observé 15 à 20 minutes après l'injection du radiotraceur.

Le modèle de lésion striatale à l'AMPA nous semble, d'après les résultats obtenus, convenir tout à fait pour une évaluation préliminaire des radioligands PBR. Deux critiques majeures peuvent cependant lui être adressées. La première concerne la variabilité importante des tailles de lésion, et la manière de définir les régions d'intérêt en conséquence. Nous avons répondu à ce problème en dupliquant les analyses (utilisation de 2 couples de régions d'intérêt) afin de vérifier la solidité des conclusions sur la valeur des radioligands testés. Une autre solution consisterait à limiter artificiellement la variabilité biologique du modèle, en excluant de l'analyse les animaux présentant une extension de la lésion au cortex piriforme, car cette caractéristique contribue fortement aux variations observées. Une autre approche pourrait utiliser le recalage des images TEP sur les images ou un atlas IRM afin de définir une région d'intérêt strictement structurale. L'utilisation d'algorithmes de segmentation ou de croissance de ROI automatique sera probablement explorée à l'avenir puisque de tels outils sont en développement au Service Hospitalier Frédéric Joliot.

La deuxième limitation importante est soulignée par les résultats de la modélisation. L'obtention de valeurs de R1 supérieures à 1, parfois de manière significative sur certains groupes d'animaux (respectivement $1,32 \pm 0,16$ et $1,26 \pm 0,08$ pour [^{11}C]DPA-713 et [^{11}C]SSR180575, par rapport à au $1,10 \pm 0,05$ pour [^{11}C]PK11195) indique que l'entrée des radiotraceurs peut être facilitée au niveau de la lésion et contribuer à l'établissement du contraste entre la lésion et le reste du parenchyme cérébral. Des variations de la perfusion et/ou la perméabilité de la BHE peuvent expliquer ce résultat. La perfusion pourrait être évaluée en faisant précéder l'injection de radioligand PBR par une injection d'eau marquée ($\text{H}_2[^{15}\text{O}]\text{O}$) (48). La BHE apparaît intacte d'après l'examen au Bleu Evans. Mais celui-ci renseigne sur la perméabilité vis-à-vis de l'albumine, et il est possible que la perméabilité soit toujours altérée après 7 jours envers une molécule lipophile de petite taille. Cependant, l'analyse des données individuelles montre l'absence de corrélation ($R^2 = 0,44$) entre les valeurs élevées de R1 ($>1,2$) et les BP résultants.

Il reste que ce modèle est peu représentatif d'une pathologie clinique, et la sélection d'un ou plusieurs radiotraceurs sur la base de celui-ci ne dispense pas d'une évaluation supplémentaire dans un modèle plus pertinent.

Modèle de neuroinflammation chronique

L'étude exploratoire menée avec les souris APPxPS1 visait à confirmer le potentiel du radioligand [¹¹C]SSR180575 dans un modèle d'inflammation chronique associée au développement d'une pathologie neurodégénérative. Bien qu'une liaison spécifique associée aux zones corticales de distribution des plaques β-amyloïdes ait été démontrée par autoradiographie *in vitro*, le [¹¹C]SSR180575 ne différencie pas clairement les souris APPxPS1 des souris contrôles PS1 sur la base de la rétention cérébrale du radiotracer. Le [¹¹C]PK11195 montre une différence plus marquée, mais non significative. Le [¹¹C]SSR180575 apparaît donc ne pas être plus sensible que le [¹¹C]PK11195 aux variations fines et précoces de l'expression de sa cible.

Chen et Guilarte (49) ont publié la seule étude d'imagerie [¹¹C]PK11195 chez la souris, intoxiquée à la cuprizone (substance démyélinisante). Ils ont détecté un accroissement significatif (facteur 2 environ) de la rétention cérébrale du [¹¹C]PK11195 en délimitant le cerveau sur les images TEP d'après celles obtenues en scanner (*Computed Tomography*). L'autoradiographie utilisant le [³H]PK11195 montrait une augmentation d'un facteur 5 au niveau du corps calleux.

Concernant notre étude, la réaction gliale associée est avérée selon la caractérisation immunohistochimique et autoradiographique, mais il semble que la sur-expression du PBR n'ait pas atteint un seuil suffisant pour être clairement détectée *in vivo*. En effet, nous avons travaillé avec des souris APPxPS1 mâles, qui développent la pathologie plus lentement que les femelles, dont proviennent les résultats déjà publiés (paragraphe 2-1). L'âge différent des souris utilisées en TEP et en autoradiographie et ou immunohistochimie ne permet pas d'assurer l'existence d'une réaction inflammatoire massive à 12 mois. Ces souris sont pour l'instant réservées à un suivi longitudinal qui déterminera une nouvelle comparaison entre radiotraceurs à l'âge de 20 mois.

Il est donc délicat de tirer une conclusion claire de ces premiers résultats, puisqu'un certain nombre de problèmes liés à l'imagerie du cerveau murin ont été mis en évidence. Le cerveau d'une souris est d'une taille critique pour l'imagerie TEP, même sous une caméra dédiée au petit animal. De plus, nous n'étions pas équipés d'un cadre stéréotaxique pour la souris, et les mouvements respiratoires ont contribué à dégrader la résolution de l'image obtenue. En l'absence de repère anatomique, la délimitation exacte du parenchyme cérébral est difficile. Une source additionnelle de variabilité provient de l'injection du radiotracer, réalisée hors caméra, avec une seringue à insuline. Le fait de ne pouvoir poser de cathéter dans la queue et d'injecter un volume extrêmement faible (50 à 150 µl) expose à une erreur potentiellement importante sur le calcul de la dose injectée.

Dans ce cas, il est logique de se tourner vers la définition d'une région de référence. La modélisation proprement dite des courbes temps-activité est peu fiable, en l'absence de mesure pendant la phase de distribution du radioligand, puisque l'animal est placé sous la caméra 45 à 60 secondes après l'injection du radiotracer. De plus, il est probable que les doses injectées chez la souris ne correspondent pas à des doses traceuses. La manipulation des données se limite donc au calcul d'un index selon le rapport des rétentions dans des ROI cible et de référence. C'est ce qui a été fait en utilisant comme ROI cible une zone englobant l'hippocampe et les régions corticales alentours, susceptible de correspondre à la zone où la pathologie amyloïde apparaît en premier, et comme ROI de référence le cervelet, épargné par

la déposition fibrillaire. Conformément à l'impression visuelle, cet index permet effectivement de différencier efficacement les souris APPxPS1 des souris PS1. Le [¹¹C]PK11195 semble à nouveau plus sensible que le [¹¹C]SSR180575, avec une différence significative plus précoce au cours de l'examen (12 min contre 30 min).

Mais la valeur du cervelet comme région de référence pose question. En effet, celui-ci montre une rétention des radiotraceurs plus élevée que le reste du cerveau. Cette rétention est clairement non spécifique du PBR et observée avec d'autres traceurs, que ceux-ci ciblent le PBR (50) ou pas ([¹⁸F]FluoroDeoxyGlucose). La vascularisation importante de cette région explique difficilement la rétention durable des traceurs sur toute la durée d'un examen (1 heure).

D'une manière générale, sur ce modèle, la spécificité du signal observé n'a pas été établie. Le plus simple consisterait à injecter en i.p. un excès de ligand avant l'injection intraveineuse du radiotraceur. La formation de métabolites n'a été examinée pour le [¹¹C]SSR180575. Concernant le [¹¹C]PK11195, d'après, De Vos *et al.*, au moins 2 métabolites sont rapidement formés dans le sang, mais ils ne pénètrent pas le tissu cérébral (23).

Le modèle d'une inflammation chronique associée au développement d'une pathologie neurodégénérative est particulièrement intéressant en vue de préciser et valider les applications cliniques supposées de l'imagerie du PBR : diagnostic précoce, évaluation thérapeutique. Mais l'imagerie des modèles murins pose un certain nombre de difficultés qui rendent peu fiables les conclusions que l'on pourrait en tirer. L'imagerie des plaques amyloïdes, qui a fait d'énormes progrès ces dernières années, se heurte aux mêmes problèmes, quelque soit le radiotraceur utilisé ([¹¹C]PIB (51), [¹⁸F]FDDNP (52)). La spécificité du site de liaison amyloïde, et la réduction de la perfusion cérébrale sont des explications avancées.

Cependant, la question posée par ce modèle est fondamentale : il s'agit de vérifier le fait qu'un contraste amélioré dans un modèle de neuroinflammation intense et aiguë se traduit effectivement par une meilleure sensibilité dans un modèle de neuroinflammation moyenne et chronique. Les données présentées ici, même parcellaires, suggèrent que ce lien n'est pas évident, et qu'il mérite d'être exploré pour sélectionner de manière efficace un radioligand d'intérêt. Les modèles d'EAE, et la caractérisation récente de modèles transgéniques de maladies neurodégénératives peuvent fournir des alternatives intéressantes pour l'imagerie du rat, techniquement plus abordable.

Conclusion

Ce travail a permis de caractériser en conditions neuroinflammatoires le comportement de radioligands spécifiques du PBR. Plusieurs composés examinés montrent un signal non spécifique diminué par rapport au traceur de référence, ce qui permet d'obtenir un contraste plus important. Le prix de l'abaissement du signal non spécifique est en général une faible biodisponibilité cérébrale, néanmoins le traceur fluoré semble manifester une excellente extraction conduisant à un accroissement du signal au site lésionnel. Ces caractéristiques contrastent avec celles des composés DAA, qui se distribuent massivement dans le parenchyme cérébrale (44), mais dont la spécificité *in vivo* est questionnée par des études récentes (15, 39). Le modèle murin n'a en revanche pas permis de tirer de conclusion claire sur la sensibilité de détection de ces radioligands.

Bibliographie de la partie C

1. Selleri S, Bruni F, Costagli C, Costanzo A, Guerrini G, et al. 2-Arylpirazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 2001;9(10):2661-71.
2. James ML, Fulton RR, Henderson DJ, Eberl S, Meikle SR, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand. *Bioorg Med Chem* 2005;13(22):6188-94.
3. Ferzaz B, Brault E, Bourliaud G, Robert JP, Poughon G, et al. SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301(3):1067-78.
4. Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, et al. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(3):828-37.
5. Vin V, Leducq N, Bono F, Herbert JM. Binding characteristics of SSR180575, a potent and selective peripheral benzodiazepine ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(3):785-90.
6. Cavallaro S, Korneyev A, Guidotti A, Costa E. Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(22):10598-602.
7. Romeo E, Cavallaro S, Korneyev A, Kozikowski AP, Ma D, et al. Stimulation of brain steroidogenesis by 2-aryl-indole-3-acetamide derivatives acting at the mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267(1):462-71.
8. Benavides J, Cornu P, Dennis T, Dubois A, Hauw JJ, et al. Imaging of human brain lesions with an omega 3 site radioligand. *Ann Neurol* 1988;24(6):708-12.
9. Dubois A, Benavides J, Peny B, Duverger D, Fage D, et al. Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain Res* 1988;445(1):77-90.
10. 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.
11. Hellier JL, Patrylo PR, Buckmaster PS, Dudek FE. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1998;31(1):73-84.
12. Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 1991;11(6):1649-59.
13. Biegon A, Alvarado M, Budinger TF, Grossman R, Hensley K, et al. Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. *J Neurochem* 2002;82(4):924-34.
14. Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Translocator protein (18 kDa) is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia* 2007.
15. Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, 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.
16. Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer 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 (Pt 11):2321-37.
17. Anzini M, Cappelli A, Vomero S, Seeber M, Menziani MC, et al. Mapping and fitting the peripheral benzodiazepine receptor binding site by carboxamide derivatives. Comparison of different approaches to quantitative ligand-receptor interaction modeling. *J Med Chem* 2001;44(8):1134-50.
18. Cappelli A, Anzini M, Vomero S, De Benedetti PG, Menziani MC, et al. Mapping the peripheral benzodiazepine receptor binding site by conformationally restrained derivatives of 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide (PK11195). *J Med Chem* 1997;40(18):2910-21.

19. Selleri S, Gratteri P, Costagli C, Bonaccini C, Costanzo A, et al. Insight into 2-phenylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides as peripheral benzodiazepine receptor ligands: synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR investigation. *Bioorg Med Chem* 2005;13(16):4821-34.
20. Anzini M, Cappelli A, Vomero S, Giorgi G, Langer T, et al. Molecular basis of peripheral vs central benzodiazepine receptor selectivity in a new class of peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. *J Med Chem* 1996;39(21):4275-84.
21. Rao VL, Butterworth RF. Characterization of binding sites for the omega3 receptor ligands [3H]PK11195 and [3H]RO5-4864 in human brain. *Eur J Pharmacol* 1997;340(1):89-99.
22. Lammertsma AA, Hume SP. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage* 1996;4(3 Pt 1):153-8.
23. De Vos F, Dumont F, Santens P, Slegers G, Dierckx R, De Reuck J. High-performance liquid chromatographic determination of [11C]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* 1999;736(1-2):61-6.
24. Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Luurtsema G, et al. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[11C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(7):842-51.
25. Turkheimer FE, Edison P, Pavese N, Roncaroli F, Anderson AN, et al. Reference and target region modeling of [11C]-(R)-PK11195 brain studies. *J Nucl Med* 2007;48(1):158-67.
26. Leutner S, Czech C, Schindowski K, Touchet N, Eckert A, Muller WE. Reduced antioxidant enzyme activity in brains of mice transgenic for human presenilin-1 with single or multiple mutations. *Neurosci Lett* 2000;292(2):87-90.
27. Czech C, Delaere P, Macq AF, Reibaud M, Dreisler S, et al. Proteolytical processing of mutated human amyloid precursor protein in transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;47(1-2):108-16.
28. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, et al. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001;306(1-2):116-20.
29. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Tremp G, et al. Reelin in plaques of beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001;316(3):145-8.
30. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, et al. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 2003;184(1):247-63.
31. Delatour B, Guegan M, Volk A, Dhenain M. In vivo MRI and histological evaluation of brain atrophy in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2006;27(6):835-47.
32. Delatour B, Blanchard V, Pradier L, Duyckaerts C. Alzheimer pathology disorganizes cortico-cortical circuitry: direct evidence from a transgenic animal model. *Neurobiol Dis* 2004;16(1):41-7.
33. Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, et al. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2004;164(4):1495-502.
34. Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Gregoire MC, James ML, et al. 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med* 2007;48(4):573-81.
35. Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Kuhnast B, Grégoire MC, et al. In vivo imaging of brain lesions with [11C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia* (In press).
36. Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, et al. PET imaging with [(11)C]PBR28 can localize and quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett* 2007;411(3):200-5.
37. Maeda J, Higuchi M, Inaji M, Ji B, Haneda E, et al. Phase-dependent roles of reactive microglia and astrocytes in nervous system injury as delineated by imaging of peripheral benzodiazepine receptor. *Brain Res* 2007.
38. Fujimura Y, Ikoma Y, Yasuno F, Suhara T, Ota M, et al. Quantitative analyses of 18F-FEDAA1106 binding to peripheral benzodiazepine receptors in living human brain. *J Nucl Med* 2006;47(1):43-50.

39. Venneti S, Wagner AK, Wang G, Slagel SL, Chen X, et al. 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* 2007.
40. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 2002;15(6):991-8.
41. Chen MK, Baidoo K, Verina T, Guilarte TR. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain* 2004;127(Pt 6):1379-92.
42. Jossierand V, Pelerin H, de Bruin B, Jegou B, Kuhnast B, et al. Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by in vivo imaging with positron emission tomography and using an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(1):79-86.
43. Petit-Taboué MC, Baron JC, Barre L, Travere JM, Speckel D, et al. Brain kinetics and specific binding of [¹¹C]PK 11195 to omega 3 sites in baboons: positron emission tomography study. *Eur J Pharmacol* 1991;200(2-3):347-51.
44. Maeda J, Sahara T, Zhang MR, Okauchi T, Yasuno F, et al. Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [¹¹C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain. *Synapse* 2004;52(4):283-91.
45. Laforest R, Sharp TL, Engelbach JA, Fettiç NM, Herrero P, et al. Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions. *Nucl Med Biol* 2005;32(7):679-85.
46. Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, et al. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [¹¹C]PK1195. *Neurology* 2000;55(7):1052-4.
47. Price CJ, Wang D, Menon DK, Guadagno JV, Cleij M, et al. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* 2006;37(7):1749-53.
48. Yee SH, Jerabek PA, Fox PT. Non-invasive quantification of cerebral blood flow for rats by microPET imaging of ¹⁵O labelled water: the application of a cardiac time-activity curve for the tracer arterial input function. *Nucl Med Commun* 2005;26(10):903-11.
49. Chen MK, Guilarte TR. Imaging the peripheral benzodiazepine receptor response in central nervous system demyelination and remyelination. *Toxicol Sci* 2006;91(2):532-9.
50. Zhang MR, Kida T, Noguchi J, Furutsuka K, Maeda J, et al. [(11)C]DAA1106: radiosynthesis and in vivo binding to peripheral benzodiazepine receptors in mouse brain. *Nucl Med Biol* 2003;30(5):513-9.
51. Bender D, Audrain H, Olsen AK, Moller A, Skovgaard-Jensen M, et al. Is aging a reason for the failure of ¹¹C-Pittsburgh compound B in transgenic mice model? *J Label Comp Radiopharm* 2007;50:S88.
52. Langer O, Kuntner C, Wanek T, Bauer M, Mandler M, et al. MicroPET imaging with [¹⁸F]FDDNP and [¹⁸F]FDG in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Label Comp Radiopharm* 2007;50:S467.

CONCLUSION

Parallèlement à l'intérêt suscité par les déterminants moléculaires de la neuroinflammation, la recherche concernant l'imagerie de ces processus est aujourd'hui très active et féconde. Le marqueur microglial PBR et sa détection par le PK11195 radiomarqué est une technique qui a fait ses preuves, et dont l'intérêt est reconnu. Mais les limites en ont été éprouvées, et de nombreuses molécules s'affirment comme des alternatives viables à ce radiotraceur de référence. Notre travail a consisté à mettre en oeuvre les outils nécessaires à la sélection préclinique d'un tel radiotraceur-candidat : modèle neuroinflammatoire, imagerie TEP du petit animal, et comparaison directe à la référence. Des résultats extrêmement prometteurs ont été obtenus, confirmant le potentiel pour l'imagerie de plusieurs molécules développées par nos collaborateurs. Notamment, la performance du radiotraceur [¹⁸F]DPA-714 retient l'attention, sachant l'impact qu'aurait la validation un traceur fluoré pour la diffusion de la méthode d'imagerie au sein des centres de recherche. L'évaluation de ce traceur chez l'homme va débiter prochainement en France (D. Guilloteau, Tours).

L'imagerie de l'activation endothéliale est une alternative séduisante à celle de la réaction gliale, qui fait l'objet de développements importants en imagerie moléculaire par IRM. Notre recherche d'un ligand oligonucléotidique se liant à la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1 n'a pas abouti, peut-être en raison de la structure particulière de la cible choisie. D'autres cibles endothéliales peuvent être envisagées (sélectines, récepteurs des chimiokines...) pour bénéficier des propriétés de biodistribution intéressantes des aptamères.

De nouveaux marqueurs de l'activation microgliale seraient également utiles pour i) distinguer les cellules microgliales résidentes des populations associées, cellules périvasculaires, dendritiques, ou cellules infiltrées, ii) détecter spécifiquement la conversion du phénotype microglial en une cellule à l'action délétère sur la population neuronale. En effet, un intérêt thérapeutique émerge actuellement envers une stratégie de modulation de la réponse microgliale, plutôt que celle d'une inhibition complète de celle-ci. Si la validité de cette approche est confirmée, il deviendra crucial de comprendre en détail la relation éventuelle de l'expression du PBR avec un phénotype microglial particulier, pour tirer la pleine mesure de l'imagerie de la neuroinflammation basée sur cette cible.

Partie B

Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (*Invitrogen Life Technologies*) supplémenté par 5% de sérum fœtal de veau (sérum inactivé par la chaleur). Les passages sont effectués tous les deux ou trois jours (lorsque les cellules adhérentes arrivent à confluence) au 1/3. La monocouche de cellules est recouverte par une solution de trypsine 1X (*Invitrogen Life Technologies*). Après 1 à 2 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont rapidement dispersées par aspiration / refoulement à la pipette pasteur puis l'action de la trypsine est neutralisée par l'ajout d'un volume de milieu additionné de sérum. Les cellules sont à nouveau dispersées et une fraction adéquate, correspondant à la dilution de passage souhaitée, est remise dans du milieu de culture « frais ». Le tout est homogénéisé et les cellules sont incubées à 37°C.

Extraction protéique

L'extraction de protéine a lieu à 4°C. Les cellules sont lysées, soit par du tampon JS (JS Buffer) : 50 mM Hepes (pH 7,5), Triton 1X, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1% Glycérol, 5 mM EDTA, soit par du tampon RIPA : 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 1% NP40, 0,5% sodium déoxycholate, 0,05% SDS, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, soit par du tampon RIPA sans SDS. Les tampons sont supplémentés par des antiprotéases (tablette anti-protéases Mini Complete *Roche Diagnostic Meylan, France*). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 11000 g 4°C 15 min. Les protéines sont dosées, soit grâce au kit de dosage BCA™ Protein Assay kit (*Pierce*), soit par le kit de coloration Bio-Rad Protein Assay adapté de la méthode de coloration de Bradford (*Biorad*) selon les instructions du fournisseur.

Western blot

Les échantillons de protéines dans du tampon de Laemmli, ainsi qu'un mélange de marqueurs de masses moléculaires, sont dénaturés par chauffage à 80°C pendant 3 minutes puis séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide discontinu (concentration/séparation) à 6%, en présence de SDS 0,1%. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon de migration SDS PAGE (200 mM Glycine ; 25 mM Trizabase ; 0,1 %SDS) à 100 V pendant 1 heure 30 environ. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (*Biorad*) à l'aide d'un appareil d'électrotransfert (*Biorad*) durant 1 heure, à 350 mA. Les bandes colorées du marqueur de masses moléculaires sont repérées sur la membrane. La membrane est saturée pendant 45 min dans une solution de saturation : T-TBS (20 mM Tris HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0,1% Tween 20 (T)), puis incubée une nuit à 4°C sous agitation dans cette même solution additionnée de l'anticorps primaire, à la dilution 1/2000. Après trois lavages de 10 minutes dans du tampon T-TBS, la membrane est incubée de même pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire. Puis la membrane est incubée dans une solution fournie par le kit ECL (*Amersham Biosciences*), selon les informations du fournisseur. Cette révélation fait apparaître une chimiluminescence, liée à la présence de peroxydase, qui impressionne un film photographique (hyperfilm ECL, *Amersham Biosciences*) que l'on expose de 10 secondes à 5 minutes.

Immunoprécipitation

60 µl de billes sépharose protéine G sont lavées deux fois dans 1ml de tampon NET150 (Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 0,05%) (centrifugation des billes 2000g 1 minute)

puis lavées deux fois par du tampon de lyse. Après lavages, les billes sont resuspendues dans 200 µl de tampon de lyse supplémenté par des antiprotéases (tablette anti protéases Mini Complete Roche Diagnostic Meylan, France). Les billes sont alors incubées 1 heure à 4°C sous agitation avec 5 µl d'anticorps anti-VCAM-1. Après 4 lavages des billes par 1 ml de tampon, 100µg de protéines extraites de cellules ajoutés. L'hybridation anticorps/protéine s'effectue sur une nuit à 4°C sous agitation modérée. Les billes sont lavées par 4 lavages dans du tampon (centrifugation douce 300g 1 minute).

SELEX

Préparation des ARN

Une nmole d'ARN 2'F-Py est radiomarquée uniformément par 1,85 MBq (50 µCi) de GTP[α-³²P] (110 TBq/mmmole soit 3000 Ci/mmmol) durant la transcription. Ces ARN (20kBq.nmmole⁻¹ ou 540nCi.nmmole⁻¹) subissent un choc thermique (2 min 80°C, 2 min sur glace puis T° ambiante) pour favoriser la formation de structures intramoléculaires.

Sélection

Les conditions de sélection sur VCAM-1,2d (quantité de cible, compétiteur non spécifique, temps d'incubation, et contre-sélection) sont décrites dans l'article inséré p117. Les conditions de sélection sur cellules sont explicitées dans le tableau p141. Après chaque tour de sélection, l'ARN 2'F-Py sélectionné est extrait par extraction phénol/chloroforme ou, pour les sélections sur cellules, par extraction au TRI Reagent (*Sigma*) selon le protocole décrit par le fournisseur. Après purification et précipitation à l'éthanol, l'ARN extrait subit un traitement DNase pour éliminer toute éventuelle contamination par de l'ADN. Deux DNases différentes ont été utilisées au cours de sélection. La DNase RQ1 (*Amersham Biosciences*) : cette enzyme est ensuite éliminée par extraction phénol/chloroform. La DNase DNA free (*Ambion*) : il s'agit d'une DNaseI recombinante fournie dans un kit contenant un réactif d'inactivation (DNA-free™). Après élimination de l'ADN et de la DNase, les ARN 2'F-Py sont précipités à l'éthanol en présence de 5µl.ml⁻¹ de coprécipitant LPA (*Ambion*). La radioactivité retenue est comptée en Cerenkov. La population extraite est amplifiée pour un nouveau cycle de sélection.

Transcription inverse

Après précipitation à l'éthanol, les ARN 2'F-Py sélectionnés sont rétrotranscrits en ADN en présence de 3,3 µM d'amorce, en utilisant la Reverse Transcriptase Superscript II (*Gibco*) (selon le protocole du fournisseur). Les séquences sont ensuite amplifiées par PCR et transcrites en ARN 2'F-Py avant d'être réutilisées pour un nouveau cycle de sélection.

Amplification des séquences

Amorces P10 et JCP40 : cf article inséré p.117.

P20 : 5'agattgcacttactatct3' ; PF10 : 5'ggtaatacgaactcactataggagataccagcttattcaatt3'

Les banques d'ADN ou les plasmides contenant les aptamères sont amplifiés par PCR en utilisant le kit de taq polymérase « hot start » Accuprim prêt à l'emploi (Accumix 2X (Invitrogen)). L'amplification se réalise en présence de 1µM de chaque amorce. Pour chaque PCR nous amplifions un témoin « négatif » permettant de vérifier l'absence de contamination. Lors de l'amplification de séquences à partir de plasmide, ce témoin contient tous les constituants nécessaires à l'amplification, la matrice étant simplement remplacée par de l'eau. Lors de la sélection, l'eau est remplacée par un échantillon d'ARN purifié n'ayant pas subi l'étape de rétrotranscription. Le protocole classique d'amplification comprend 4 minutes d'activation de l'enzyme à 95°C, puis des cycles comprenant 30 secondes à la température de dénaturation (95°C), une minute à la température d'hybridation des amorces (57°C) et 1 minute 30 secondes à la température d'élongation des amorces (72°C).

Le rendement d'amplification est vérifié par migration d'un échantillon de PCR et d'un marqueur de poids moléculaire quantitatif smartladder SF (Eurogentec) sur gel d'agarose (Eurobio) 3% en présence de BET (Sigma). Les produits de PCR sont concentrés 3 fois sur centricon YM30 (Millipore) (selon le protocole décrit par le fournisseur) avant d'être utilisés pour la transcription.

Transcription par l'ARN polymérase T7 mutante Y639F

Les séquences amplifiées par PCR sont transcrites en ARN 2'Fluoro-Pyrimidine sur la nuit. Cette réaction se fait à 37°C en présence de 40mM Tris (pH8), 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM spermidine, 1mg.ml⁻¹ pyrophosphatase inorganique (Roche Diagnostics) et 1mM de chaque nucléotide (ATP, GTP (Amersham Biosciences), 2'F-CTP, 2'F-UTP (Tebu)). L'enzyme utilisée est une forme mutante de l'ARN polymérase du phage T7 (Y639F) qui permet l'incorporation des bases pyrimidiques modifiées en 2' fluoro. Cette enzyme a été purifiée au laboratoire. Pour la sélection, la réaction se fait en présence de 3,7 MBq/ml de GTP[α 32P].

Purification sur gel des ARN 2'F-Py transcrits in vitro

Après transcription, la matrice ADN est dégradée par l'action de la DNase RQ1 (100 U.ml⁻¹) (Amersham Biosciences). L'ARN 2'Fluoro-Pyrimidine (ARN 2'F-Py) est purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (TBE 1X, 6% acrylamide/bis acrylamide 19:1, 7M urée ; 0,01% APS ; TEMED 0,1%). Après détection par ombre UV, l'ARN 2'F-Py contenu dans le gel est électroélué par le centrieluter (Millipore) puis concentré sur centricon YM30 (selon les instructions du fournisseur). L'ARN 2'F-Py est quantifié par spectrophotométrie d'absorption UV selon l'approximation 1DO = 40 μ g.ml⁻¹.

Séquençage des banques sélectionnées

Les séquences obtenues après les tours de sélection ont été clonées dans le vecteur TopoTA en utilisant le Kit TopoTA (Invitrogen) selon le protocole décrit par le fournisseur. Le séquençage a été confié à la société MWG Biotech (Ebersberg Allemagne). Les séquences obtenues ont été comparées en utilisant le logiciel Clustal. La prévision de structure est établie grâce au logiciel MFold.

Evaluation in vitro des caractéristiques des banques sélectionnées et des aptamères individuels

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Une amorce est radiomarquée en 5' avec 7,4 MBq (200 μ Ci) d'ATP[γ 32P] (185 TBq/mmmole soit 5000 Ci/mmmole) par action de la kinase T4 (Invitrogen) (selon les instructions du fournisseur) puis purifiées par chromatographie d'exclusion (Micro Bio-Spin Sp6 Chromatography Columns (Biorad)) selon le protocole décrit par le fournisseur. Elle est ensuite utilisée pour amplifier 0,5 μ l des PCR issues des différents tours de sélection dans un volume final de 50 μ l. Les amplifiats sont purifiés sur colonne d'exclusion (Micro Bio-Spin Sp30 Chromatography Columns (Biorad)). Un échantillon de chaque PCR représentant une quantité équivalente de radioactivité est incubé 2h à 37°C avec 40 μ l d'un mélange d'enzymes de restriction contenant 10 U de Rsa I, Alu I, Hae III (Invitrogen Life Technologies), Hin PI (New-England Biolabs) dans du réactif I d'Invitrogen (Invitrogen Life Technologies). Le mélange est ensuite précipité à l'éthanol en présence de 25 μ g de LPA (Ambion). Les culots sont repris dans 10 μ l d'H₂O et 10 μ l de tampon de migration dénaturant. 10 μ l de ce mélange sont déposés sur gel d'électrophorèse 6% acrylamide/bis-acrylamide (19 :1), urée 7M, APS 0,01%, TEMED 0,1%, TBE 1X. Après séchage sous vide, le gel est analysé à l'aide du Phosphor Imager (Amersham Biosciences).

Expérience d'évaluation d'affinité sur filtre

Décrite dans l'article inséré, p117.

Expérience d'évaluation d'affinité sur cellules

Les cellules sont mises en culture en plaques 24 puits. Les cupules recouvertes de collagène de type I sont prêtes à l'emploi (Biocoat Becton Dickinson) et sont utilisées comme des plaques de cupules classiques. L'expérience de mesure d'affinité se réalise sur des cellules à confluence soit deux jours après la mise en culture. Les oligonucléotides sont déphosphorylés 1 heure à 65°C par 40 U de phosphatase BAP (Invitrogen) par nmole d'ARN 2'F-Py. Après extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol en présence de 20 µg de LPA (Ambion) comme coprécipitant, un 32P est ajouté à leur extrémité 5' par la T4 kinase (selon les instructions du fournisseur). Les ARN 2'F-Py (2,3 MBq/pmole ou 63nCi.pmole-1) sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion (Micro Bio-Spin Sp30 Chromatography Columns (Biorad)). Leur marquage spécifique est contrôlé par mesure de la radioactivité (cpm) associée à 1pmole d'ARN 2'F-Py au compteur à scintillation Cerenkov. Préalablement à toute expérience de mesure d'affinité, les ARN 2'F-Py subissent un traitement thermique pour favoriser les structures intramoléculaires. Ils sont dénaturés à 85°C pendant 2 minutes, refroidis immédiatement dans la glace puis équilibrés à température ambiante. Un compétiteur non spécifique (selon le cas, ARN total (ARNt) (Sigma), ADN de sperme de saumon (ADNss) (Sigma) ou poly Inosine (PolyI) (Sigma)) est ajouté à une concentration finale de 100µg.ml-1 pour diminuer la fixation non spécifique des aptamères. Les aptamères radiomarqués en 5' sont alors incubés sur la surface cellulaire d'une flasque de 75 cm² cellules dans du milieu RPMI 1640 pendant 10 minutes à température ambiante : le milieu est éliminé avant de déposer goutte à goutte 200µl d'aptamères radiomarqués à la concentration voulue. Après incubation, le surnageant radioactif est éliminé par pipetage. Cinq lavages sont réalisés par dépôt sur les cupules de 500µl de RPMI 1640 et élimination immédiate du liquide par aspiration à la pipette pasteur. L'ARN 2'F-Py est récupéré par la lyse des cellules de chaque cupule. La radioactivité de ces extraits est mesurée au compteur à scintillation Cerenkov tandis que 25µl d'extraits protéiques sont utilisés pour le dosage des protéines contenues dans chacun des puits. Trois cupules n'ayant pas été en présence d'ARN 2'F-Py radiomarqués mais de RPMI seul sont réservées au comptage des cellules et vérification de l'expression des protéines d'intérêts. Pour le comptage des cellules, immédiatement après la fin des lavages, les cellules sont décrochées de la cupule par 500µl de trypsine (Invitrogen Life Technologies) et comptées sur cellules de Malassez. Pour vérification de l'expression protéique, 100µl de tampon de lyse JS avec inhibiteurs de protéases et de phosphatases sont déposés sur une cupule, la plaque 24 puits ayant été placée sur un lit de glace. Les protéines peuvent ainsi être récupérées, clarifiées dosées et analysées par la technique de western blot.

Pontage aux UV (cross-link) des aptamères à leur cible protéique

200µl de RPMI 1640 contenant des ARN 2'F-Py radiomarqués uniformément (100 nM/5.106 cpm), ayant subi le même traitement thermique que lors des expériences de mesure d'affinité, sont mis au contact des cellules adhérentes sur une boîte de culture. Après 15 min d'incubation dans l'étuve de culture à 37°C, les ARN non liés sont éliminés et 200 µl de RPMI 1640 sont ajoutés. Les cellules sont alors irradiées aux UV (254 nm) à l'aide de l'appareil UV Stratalinker® 1800 (Stratagène) afin qu'elles ne se dessèchent pas durant l'irradiation, les cellules sont placées sur un lit de glace. Le milieu est alors éliminé, les cellules sont incubées 30 minutes à l'étuve à 37°C avec 300 µl de PBS auxquels sont ajoutées les RNases A (10 mg.ml-1) et T1 (50 U.µl-1). Après élimination des enzymes, les cellules sont lysées par le tampon JS. Puis, 30 µl des échantillons protéiques clarifiés obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (10%). La taille des protéines révélées par PhosphorImager est estimée par comparaison avec la migration d'un marqueur de taille coloré (Precision Plus Protein Standard Biorad).

Partie C

Tous les protocoles sont décrits dans les articles et rapport insérés p163-164.

Les études statistiques des données TEP ont employé le test de Mann-Whitney. Les données d'autoradiographie ont été comparées avec un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Bonferroni, ou de Dunnett, lorsque le nombre de degré de liberté (de conditions d'incubation) était suffisant (≥ 5).

Développement de radiotraceurs de la neuroinflammation pour l'imagerie des pathologies neurodégénératives

Des processus inflammatoires tels que l'activation des cellules microgliales et de l'endothélium vasculaire sont impliqués dans de nombreuses pathologies neurodégénératives. L'imagerie de la neuroinflammation offre des perspectives d'étude, de diagnostic précoce, et d'évaluation thérapeutique pour un large spectre de neuropathologies. Premièrement, un aptamère a été sélectionné contre un fragment recombinant de la cible endothéliale VCAM-1, mais perd sa spécificité de reconnaissance de la protéine lorsqu'elle est exprimée en conformation native par la cellule. Deuxièmement, cinq radioligands du récepteur périphérique aux benzodiazépines, marqueur de l'activation microgliale, ont été évalués *in vivo* en imagerie TEP et comparés au [¹¹C]PK11195 en utilisant des rats lésés. Quatre ont montré des performances supérieures au [¹¹C]PK11195 via un contraste amélioré. Dans un domaine en pleine expansion, ces travaux définissent un crible efficace pour la sélection d'un radiotraceur d'intérêt.

Mots-clés : neuroinflammation, imagerie, TEP, aptamère, VCAM-1, microglie, PBR, PK11195

Development of PET tracers for neuroinflammation imaging in neurodegenerative diseases

Inflammatory processes such as microglial or endothelial activation are involved in many neurodegenerative conditions. Neuroinflammation imaging is considered an attractive tool for fundamental research, diagnosis and therapeutic evaluation in neuropathologies. First, an aptamer was selected against a recombinant fragment of the endothelial target VCAM-1, but proved unable to bind the target protein in native conformation, as expressed by a cell line. Second, five radioligands of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), a marker of microglial activation, were evaluated *in vivo* using PET (Positron Emission Tomography) imaging in a rat model of neuroinflammation, and were compared to [¹¹C]PK11195. Four radiotracers displayed a better contrast than [¹¹C]PK11195. In a competitive field of research, this work demonstrates the efficiency of *in vivo* screening of radiotracers for fast selection of clinically relevant molecules.

Key-words : neuroinflammation, imaging, PET, aptamer, VCAM-1, microglia, PBR, PK11195