



HAL
open science

Développement de médicaments radiopharmaceutiques TEP en neurologie.

Sophie Lancelot

► **To cite this version:**

Sophie Lancelot. Développement de médicaments radiopharmaceutiques TEP en neurologie.. Neurosciences. Université lyon 1, 2023. tel-04933735

HAL Id: tel-04933735

<https://hal.science/tel-04933735v1>

Submitted on 6 Feb 2025

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Mémoire présenté devant
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Pour l'obtention du
Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

Soutenance publique le 28 juin 2023 par

Sophie LANCELOT

**Développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP
(Tomographie par Émission de Positons) en neurologie**

Devant le jury composé de :

Pr Alain FAIVRE-CHAUVET	PU-PH, Nantes	Rapporteur
Pr Catherine GHEZZI	PU, Grenoble	Rapporteuse
Dr Bertrand KUHNAST	DR CEA, Paris Saclay	Rapporteur
Dr Bénédicte BALLANGER	CR, Lyon	Examinatrice
Dr Thierry BILLARD	DR, Lyon	Examineur

Directeur d'HDR

Pr Luc ZIMMER PU-PH, Lyon

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux rapporteurs de ce mémoire : **Madame Catherine GHEZZI, Monsieur Alain FAIVRE-CHAUVET et Monsieur Bertrand KUHNAST** d'avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture et l'analyse de ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout particulièrement les autres membres du jury :

Madame Bénédicte BALLANGER pour son amitié surtout, mais aussi pour les travaux passés, présents et à venir, sa persévérance et sa redoutable efficacité dans la conduite des RIPH.

Monsieur Thierry BILLARD dont l'importance du travail en collaboration avec l'équipe BIORAN transparait au travers de ce mémoire.

Monsieur Luc ZIMMER pour m'avoir dirigée et accompagnée depuis une quinzaine d'années déjà... pour le meilleur et pour le pire.

Je pense évidemment à **Monsieur Didier LE BARS**, MCU-PH (Université Lyon 1, Hospices Civils de Lyon) Radiopharmacien du CERMEP depuis sa création en 1987 et pendant 35 ans ! Une vie professionnelle au service de la recherche des autres, une entrée au panthéon du CERMEP et plus personnellement cinq années de complicité inoubliables...

Je voudrais également exprimer mon amitié :

A **l'équipe du CERMEP et l'équipe BIORAN**, et plus particulièrement à celles et ceux du premier cercle (qui se reconnaîtront) pour leur bonne et mauvaise humeur, leur soutien et qui font que travailler au CERMEP reste toujours un plaisir.

A **tous mes compagnons de route** lyonnaise, marseillaise et clermontoise.

Enfin, mes pensées vont tout naturellement à :

Cyril et Andrea,

Ma famille,

Mes amis.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	6
PARTIE I : TITRES ET TRAVAUX	8
1. CURRICULUM VITAE	8
1.1. Etat civil.....	8
1.2. Situation professionnelle actuelle et renseignements administratifs.....	8
1.3. Parcours et diplômes universitaires	9
1.4. Titres et fonctions universitaires	9
1.5. Titres et fonctions hospitaliers	10
2. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT	10
2.1. Enseignements à la faculté de Pharmacie, Médecine Lyon Est et Médecine Lyon Sud, Université Lyon 1	10
2.2. Enseignements divers.....	12
2.3. Pratiques pédagogiques innovantes	12
2.4. Contrats pédagogiques obtenus	13
3. ACTIVITES HOSPITALIERES	13
4. ENCADREMENT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE	15
4.1. Encadrement universitaire.....	15
4.2. Encadrement hospitalier	16
5. RESPONSABILITES ET ACTIVITES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES ADMINISTRATIVES.....	16
5.1. Responsabilités nationales	16
5.2. Responsabilités hospitalières.....	17
5.3. Activités d'intérêt collectif.....	17
5.4. Responsabilités pédagogiques	17
5.5. Activités d'expertise	18
6. ACTIVITES SCIENTIFIQUES	18
6.1. Production scientifique	18
6.2. Analyse bibliométrique	27
6.3. Conférences sur invitation	27
6.4. Valorisation	28
6.5. Activités d'expertise	28

6.6.	Activité éditoriale	28
6.7.	Participation à l'organisation de colloques/congres	28
6.8.	Participation à des Sociétés savantes nationales/internationales et réseaux de recherche.....	29
4.1.	Jury Thèses de sciences	29
4.2.	Participation à des comités de sélection	30
4.3.	Contrats de recherche et financements.....	30

PARTIE II : ACTIVITES DE RECHERCHE35

1.	ACTIVITES DE RECHERCHE POST DOCTORALE	35
1.1.	Imagerie TEP de l' α -synucléine.....	36
1.2.	Vers le premier radiotracteur TEP des récepteurs sérotoninergiques 5-HT ₆	43
1.3.	Développement d'un radiopharmaceutique agoniste des récepteurs 5-HT _{1A}	50
2.	PERSPECTIVES, PROJETS DE RECHERCHE	58
2.1.	Poursuite du développement du premier radiotracteur TEP des récepteurs 5-HT ₆ ..	58
2.2.	Utilisation du [¹⁸ F]F13640 en recherche clinique.....	60
2.3.	Etude du rôle de la sérotonine dans la dégénérescence fronto-temporale (DFT)....	64
3.	CONCLUSION	65
4.	BIBLIOGRAPHIE.....	66

PARTIE III : PUBLICATIONS REPRESENTATIVES.....84

INTRODUCTION

Mes activités de recherche s'effectuent au sein de l'équipe BIORAN du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) et du département de radiopharmacie de la plateforme d'imagerie du CERMEP sur le site du Groupement Hospitalier Est (GHE) des Hospices Civils de Lyon (HCL).

L'équipe **BIORAN** (biomarqueurs radiopharmaceutiques et neurochimiques), dirigée par le Pr Luc Zimmer, rassemble des scientifiques dont la thématique est axée sur l'imagerie moléculaire et la biochimie des processus neurodégénératifs, englobant toutes les composantes et compétences nécessaires pour apporter des contributions à une meilleure compréhension des voies moléculaires fondamentales des pathologies cérébrales et pour traduire ces découvertes en pratique clinique (aide diagnostique, développement de nouveaux médicaments...).

Dans ce contexte, la tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie très intéressante puisqu'elle permet la visualisation et la quantification de cibles moléculaires cérébrales *in vivo* chez l'animal ou l'homme.

Dans le domaine de la TEP en neurologie, les principaux objectifs de la recherche en radiopharmacie sont de développer de nouveaux traceurs radioactifs couplés à des isotopes innovants pour la recherche afin 1/ d'élucider *in vivo* les mécanismes physiopathologiques et neuropharmacologiques liés à une cible pharmacologique, 2/ d'étudier de nouveaux traitements et 3/ de mettre à disposition des médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux pour les essais cliniques diagnostiques et/ou thérapeutiques.

Notre ambition est de réaliser de nouvelles preuves de concept dans le domaine de l'imagerie moléculaire, d'effectuer la démonstration initiale sur des modèles animaux et, en cas de succès, sur des tissus humains et un petit nombre de sujets (étude de première administration) pour, enfin, diffuser les méthodes.

Pour le développement de nouveaux radiotraceurs, le projet de l'équipe BIORAN s'appuie principalement sur l'infrastructure de la plateforme d'imagerie du CERMEP, dirigée par Luc Zimmer. Cette plateforme est notamment dédiée à la recherche en imagerie TEP et bénéficie d'une implantation hospitalière privilégiée (hôpital neurologique, cardiologique, psychiatrique, pôle femme-mère-enfants, centre de biologie et biochimie clinique, centre de radiothérapie).

Mes fonctions hospitalières et scientifiques respectives, en tant que responsable du département de radiopharmacie du CERMEP et membre de l'équipe BIORAN, me donnent un accès direct à plusieurs équipements :

- un cyclotron biomédical,
- un plateau de radiochimie/radiopharmacie TEP équipé d'automates de synthèses pour le radiomarquage au fluor 18 ou carbone 11,

- un plateau de radiopharmacologie *in vitro* (systèmes de stéréotaxie, cryostat, autoradiographie),
- un plateau d'imagerie *in vivo* préclinique et clinique (microTEP/CT, microIRM 7T, TEP/CT et IRM humaines).

Cet environnement me permet de mener des travaux de recherche translationnels depuis la production de radionucléide, le développement de nouveaux radiotraceurs jusqu'à la mise à disposition de radiotraceurs pour la recherche préclinique ou de médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux pour les essais cliniques diagnostiques chez l'Homme.

La première partie de ce manuscrit présente une vue d'ensemble de mon parcours hospitalo-universitaire, de mes activités hospitalières, d'enseignement et d'encadrement d'étudiants mais également de production scientifique. Ce rapport est ensuite consacré à mes activités de recherche ainsi que les projets à venir. Les publications les plus représentatives de mes travaux sont insérées en annexe de ce rapport.

PARTIE I : TITRES ET TRAVAUX

1. CURRICULUM VITAE

1.1. ETAT CIVIL

LANCELOT Sophie

Née le 23 mars 1977

Situation familiale : union libre, 1 enfant

1.2. SITUATION PROFESSIONNELLE ACTUELLE ET RENSEIGNEMENTS ADMINISTRATIFS

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Corps-grade : MCU 1^{ère} classe, 3^{ème} échelon

Date de nomination dans le corps : 1^{er} novembre 2011

Section CNU : 80^{ème} « Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé »

Établissements d'affectation :

ISPB (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques), Faculté de Pharmacie de Lyon, Université Lyon 1

Service Pharmaceutique du Groupement Hospitalier Est (GHE), Radiopharmacie CERMEP, Hospices Civils de Lyon (HCL)

Activités hospitalo-universitaires et activités de recherche :

Département pédagogique de Sciences Physico-chimiques et Pharmacie Galénique

Faculté de Pharmacie, Université Lyon 1, 8 avenue Rockefeller, 69373 LYON Cedex 08

Directeur : Pr Claude DUSSART

Tél. : 04 78 77 70 10

E-mail : sophie.lancelot@univ-lyon1.fr

Radiopharmacie CERMEP

Groupement Hospitalier Est, 59 boulevard Pinel, 69677 BRON cedex

Directeur CERMEP : Pr Luc ZIMMER

Chef de service Pharmacie : Dr Valentine BREANT

Tél. : 04 72 68 86 32

E-mail : sophie.lancelot@chu-lyon.fr

Equipe BIORAN (Pr Luc Zimmer), Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, INSERM U1028 - CNRS UMR5292, Université Claude Bernard Lyon 1
 CERMEP, Groupement Hospitalier Est, 59 boulevard Pinel, 69677 BRON cedex
 Directeur : Dr Olivier BERTRAND

1.3. PARCOURS ET DIPLOMES UNIVERSITAIRES

2023	Renouvellement formation Bonnes Pratiques Cliniques (ICH E6 (R2))
2021-22	Mobilité post-doctorale CERIMED (Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale) et Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN), Aix-Marseille Université
2009	Responsable scientifique d'expérimentation animale (niveau 1) ENS, Université Claude Bernard Lyon I
2008	Concours National de Praticien Hospitalier (inscription sur liste d'aptitude)
2005-07	D.E.S.C. de Radiopharmacie et Radiobiologie Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires (INSTN), Saclay
2004-07	Doctorat d'Université , Université de la Méditerranée (Sciences de la Vie et de la Santé)
2006	Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Faculté de Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée
2002-06	D.E.S. de Pharmacie Hospitalière et des Collectivités Faculté de Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée
2004	D.E.A. de Chimie Moléculaire et Molécules Bioactives Université de la Méditerranée
2003	D.I.U. « CESAM » Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée
1995-2002	Etudes de Pharmacie Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne
1995	Baccalauréat série S-math

1.4. TITRES ET FONCTIONS UNIVERSITAIRES

Depuis nov 2011	MCU-PH en Biophysique à la faculté de Pharmacie de Lyon (Université Lyon 1)
2008-2011	Maître de conférences en Biophysique à la faculté de Pharmacie de Lyon (Université Lyon 1)

2006-2008	ATER 50% en Biophysique à la faculté de Pharmacie de Lyon (Université Lyon 1)
2007	D.E.S.C. de Radiopharmacie et Radiobiologie , Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, Saclay
2004-07	Doctorat d'Université , Université de la Méditerranée
2006	Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie Faculté de Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée
2002-06	D.E.S. de Pharmacie Hospitalière et des Collectivités Faculté de Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée
2004	D.E.A. de Chimie Moléculaire et Molécules Bioactives , Université de la Méditerranée

1.5. TITRES ET FONCTIONS HOSPITALIERS

Juil 2017-...	MCU-PH en Radiopharmacie, CERMEP (HCL)
2013-Juin2017	MCU-PH en Radiopharmacie, GCS LUMEN (HCL-CLCC CLB)
Nov 2011-2012	MCU-PH en Radiopharmacie, Groupement Hospitalier E. Herriot (HCL)
2007-oct 2011	Praticien Attaché 60 % en Radiopharmacie, Groupement Hospitalier E. Herriot (HCL)
Nov 2006-déc 06	Praticien Attaché 50 % en Radiopharmacie, Hôpital Timone (AP-HM)
2002-2006	Interne en Pharmacie Hospitalière des Hôpitaux de Marseille (AP-HM)

2. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

2.1. ENSEIGNEMENTS A LA FACULTE DE PHARMACIE, MEDECINE LYON EST ET MEDECINE LYON SUD, UNIVERSITE LYON 1

Depuis 2006, j'enseigne la **Biophysique**, d'abord en tant qu'ATER puis Maître de Conférences et enfin **MCU-PH** à la faculté de Pharmacie de Lyon, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB), Université Lyon 1, dans le département pédagogique des Sciences Physico-chimiques et Pharmacie Galénique.

J'interviens principalement dans le cadre de la formation commune de base.

La Table 1 synthétise la répartition de mes principaux enseignements depuis 2006.

Période	1 ^{ère} année Pharmacie PACES PASS/LAS Médecine Lyon Est et Lyon Sud	FCB Pharmacie FGSP/FASP (2 à 4 ^{ème} année) ISPB	Filière Pharmacien -ingénieur ISPB	Filière internat ISPB	Filière officine ISPB	MASTER M2, ISPB M1, Médecine Lyon Est	Total annuel* (h Eq TD)
ATER 50% en Biophysique, ISPB, Université Lyon1							
2006-08	TD (55 h)	TP (50 h)					105
MCU et MCU-PH en Biophysique, ISPB, Université Lyon1							
2008-10	TD (80 h)	TP (100 h)	CM, TD (20 h)				200
Introduction PACES							
2010-13	CM + forum (15 h)	TD, TP (105 h)	CM, TD (25 h)				200
2013-15	CM + forum (5 h)	CM, TD, TP (98 h)	CM, TD (25 h)		CM (3 h)		210
2015-18	CM, TD (32 h)	CM, TD, TP (58 h)	CM, TD (30 h)		CM (3 h)	CM, TD (10 h)	200
2018-21	CM, TD (35 h)	CM, TD, TP (70 h)	CM, TD (25 h)	TD (10h)	CM (3 h)	CM, TD (35 h)	220
2021-2022 Mobilité							
2022-23	CM, TD (25 h)	CM, TD, TP (70 h)	CM, TD (15 h)	TD (10h)	CM (3 h)	CM, TD (35 h)	220

* le total annuel des heures est obtenu en ajoutant les heures attribuées pour l'encadrement d'étudiants (thèses de pharmacie, stages hospitaliers) et les responsabilités administratives

Table 1 : Répartition de mes principales charges d'enseignement depuis 2006

THEMATIQUES DES ENSEIGNEMENTS :

1^{ère} année de Pharmacie (2006-2010)

TD : métrologie, électrostatique, rayonnements ionisants, interaction rayonnements-matière, radioactivité, mécanique des fluides, optique, transports membranaires, états de la matière.

PACES (2010) puis PASS/LAS (depuis 2020) :

Depuis la rentrée 2010, la mise en place de la PACES a considérablement modifié l'enseignement de la Biophysique en première année. Les travaux dirigés se sont transformés en « cours applicatifs », en simultané, à l'ensemble des étudiants. Aussi, nous avons mis en place des pédagogies innovantes notamment sous forme de capsules vidéo, d'exercices dirigés à distance, de forum (forum de discussion et réponses aux questions des étudiants) qui fonctionnent par l'intermédiaire de plateformes numériques (SPIRAL, Claroline, SIDES).

Cours magistraux : interactions rayonnements matière, radioactivité, métrologie, thermodynamique

Forum

FGSP (Formation Générale des Sciences Pharmaceutiques) :

Cours magistraux : dosimétrie, radiobiologie, radiopharmacie

Travaux dirigés : dosimétrie, radiobiologie, optique physiologique, acoustique physiologique, tension superficielle, viscosimétrie

Travaux pratiques : optique physiologique, acoustique physiologique, radiobiologie, radioprotection, réfractométrie, microscopie, tension superficielle, viscosimétrie, polarimétrie

FASP (Formation Approfondie des Sciences Pharmaceutiques) :

Cours magistraux : imagerie médicale, radiothérapies

Filière Officine :

Cours magistraux : risque nucléaire/distribution d'iode

Filière Pharmacien Ingénieur :

Cours magistraux et travaux dirigés : imagerie médicale, mécanique du point, encadrement projet d'élève, informatique

Filière Internat :

Travaux dirigés : rayonnements ionisants, radioactivité, radiopharmacie

Master 1 / parcours Initiation à la Recherche Biomédicale, Faculté de Médecine Lyon Est

Cours magistraux : imagerie médicale, R&D en radiopharmacie

Master 2 « Sciences du médicament et des Produits de Santé »

Cours magistraux : imagerie médicale, R&D en radiopharmacie

2.2. ENSEIGNEMENTS DIVERS

2007-2018	Formation des Préparateurs en Pharmacie Hospitalière (CFPPH, Lyon) (~ 6 h/an)
2007-2013	Formation à la radioprotection patients (HCL) (~ 5 h/an)
2007-2015	UE optionnelle du DES de Médecine Nucléaire (INSTN, Saclay) (2 h tous les 2 ans)
2007-2013	Formation à la radioprotection patients (HCL) (~ 5 h/an)
2008-2011	Cycle d'Initiation au Développement REglementaire d'un candidat Médicament (CIDREM) (20h) - Axe I Programme Structurant ProCan du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)

2.3. PRATIQUES PEDAGOGIQUES INNOVANTES

2020-2021	Création de capsules vidéo pour les enseignements de Biophysique en LAS Thématiques : métrologie, interactions rayonnements-matière
-----------	---

Création de **QCMs d'autoévaluation** en LAS

2016-2017 Création de **capsules vidéo : Les petits films analytiques** – Gestes techniques en sciences analytiques
Thématiques : utilisation pipettes, pesées, dilutions

2.4. CONTRATS PEDAGOGIQUES OBTENUS

Comme co-investigateur

- **Appel à projet « PLATEFORMES D'ENSEIGNEMENT 2016-2017 », Université Lyon1**
Appel à projet plateforme pédagogique APPP 2016-2017
Plateforme pédagogique **Matières Premières et Produits Pharmaceutiques - MP3**
Financement 2017 : 45 k€ (UPLC)
- **Appel à projet « PLATEFORMES D'ENSEIGNEMENT 2015-2016 », Université Lyon1**
Appel à projet plateforme pédagogique APPP 2015-2016
Plateforme pédagogique **Matières Premières et Produits Pharmaceutiques - MP3**
Financement 2016 : 50 k€ (spectromètre proche-IR)
- **Appel à projet TICE et pédagogie, Université Lyon1**
Pratiques pédagogiques innovantes PPI 2016
Titre du projet : **Les petits films analytiques – Gestes techniques en sciences analytiques**
Réalisation de films avec la cellule ICAP (Innovation, Conception et Accompagnement pour la Pédagogie) de l'Université Lyon 1

3. ACTIVITES HOSPITALIERES

De **2002 à 2006**, j'ai effectué mon internat en Pharmacie Hospitalière à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille. Au cours des deux premières années, j'ai effectué mes stages, dans différents services en Pharmacie Hospitalière. Dès 2004, je me suis spécialisée en radiopharmacie (Service de Médecine Nucléaire du CHU Timone de Marseille, Pr O. Mundler ; Service Radiopharmacie, Pr P. Pisano) et ai participé à une activité de recherche en partenariat avec différentes équipes médicales.

A partir de janvier 2007, j'ai rejoint la radiopharmacie du Groupement Hospitalier Edouard Herriot (GHEH) aux Hospices Civils de Lyon (Fédération de Médecine Nucléaire-

Radiopharmacie, Pr M. Janier ; Service Pharmacie, Dr C. Pivot) à la suite de l'ouverture d'un poste de radiopharmacien praticien attaché (60%) avec une composante universitaire (ATER 50 %). **De 2008 à 2012**, j'ai exercé la fonction de **radiopharmacien co-responsable de l'UF Radiopharmacie** à l'hôpital Edouard Herriot (d'abord 0,6 ETP puis 0,5 ETP à partir de novembre 2011). Dans ce cadre, j'ai dirigé une équipe de deux techniciens de laboratoire et d'un préparateur en pharmacie. Notre service possédait 2 gamma-caméras et les compétences techniques nécessaires à la réalisation des marquages cellulaires (leucocytes et globules rouges) pour les explorations hématologiques et scintigraphiques.

Début 2013, la Fédération de Médecine Nucléaire-Radiopharmacie d'Edouard Herriot a été intégrée dans un **Groupe de Coopération Sanitaire (GCS)** en partenariat avec le service de Médecine Nucléaire du Centre Léon Bérard (CLB), Centre Régional de Lutte Contre le Cancer. Cette structure commune HCL-CLB, située sur le site du CLB, avait clairement pour vocation de développer l'activité externe et les activités de recours diagnostiques et thérapeutiques. Dans le cadre de ce projet, **j'ai rejoint cette structure de 2013 à 2017** afin d'assurer l'activité de radiopharmacie. Une équipe composée de 9 à 11 manipulateurs en électroradiologie médicale travaillait sous l'autorité des radiopharmaciens pour assurer l'activité de radiopharmacie. Ce regroupement disposait de 3 gamma-caméras/SPECT-CT et 2 caméras TEP-CT.

Depuis 2017, j'exerce les fonctions de **radiopharmacien à la radiopharmacie du CERMEP**. Le CERMEP est un GIE regroupant les tutelles : HCL, CNRS, INSERM et Université de Lyon.

Je suis **responsable du département radiopharmacie** depuis 2019 avec Didier Le Bars. L'équipe est composée de deux radiopharmaciens hospitalo-universitaires, un cyclotroniste, un analyste et trois radiochimistes.

La radiopharmacie du CERMEP, PUI du GHE (HCL) assure la recherche et le développement, la fabrication et la gestion des médicaments radiopharmaceutiques TEP destinés à la recherche. Ces médicaments radiopharmaceutiques sont destinés :

- à la recherche impliquant la personne humaine (RIPH) dans le cadre d'essais cliniques de promotion académique ou industrielle ;
- à la recherche préclinique.

Les activités de la Radiopharmacie du CERMEP comportent notamment :

- la synthèse et la préparation de médicaments radiopharmaceutiques non disponibles sur le marché rendus nécessaires pour la recherche ;
- le développement de nouveaux médicaments radiopharmaceutiques et de nouveaux candidats radiotraceurs en collaboration avec des équipes de recherche hospitalo-universitaires ou des partenaires industriels ;
- le transfert de la recherche et du développement radiochimique et préclinique vers les premiers essais cliniques.

La radiopharmacie du CERMEP, HCL est **certifiée ISO 9001**.

4. ENCADREMENT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

4.1. ENCADREMENT UNIVERSITAIRE

ENCADREMENT DOCTORAL			
PERIODE	ENCADREMENT ET ECOLE DOCTORALE	ETUDIANT(E)	TITRE THESE D'UNIVERSITE ET DATE DE SOUTENANCE
2019-23	Co-encadrement avec le Pr L. Zimmer (50/50%) Ecole Doctorale EDISS, Lyon 1	Pierre Courault	« Première administration chez l'Homme du radiopharmaceutique TEP [¹⁸ F]F13640 : modélisation et perspectives cliniques », soutenance 12 juillet 2023
2012-15	Co-encadrement avec le Pr L. Zimmer (50/50%) Ecole Doctorale des Neurosciences et Cognition, Lyon 1	Elise Levigoureux	« Imagerie TEP de l'alpha-synucléine », soutenue le 18 décembre 2015

ENCADREMENT DE M2-R			
PERIODE	ENCADREMENT	ETUDIANT(E)	MASTER
2018-19	Encadrement 100%	Pierre Courault	« Modification de l'expression des récepteurs 5-HT ₆ à différents stades de la maladie d'Alzheimer : étude <i>post mortem</i> à l'aide du radiotracer TEP [¹⁸ F]2FNQ1P » Master Sciences du Médicament, Innovations Pharmaceutiques et Développement Analytique, Lyon 1
2017-18	Encadrement 100%	Stéphane Emery	« Caractérisation du [¹⁸ F]2FNQ1P, radiotracer TEP spécifique des récepteurs 5-HT ₆ chez le rat, le porc et les tissus humains » Master Sciences du Médicament, Innovations Pharmaceutiques et Développement Analytique, Lyon 1
2011-12	Co-encadrement 50%	Elise Levigoureux	« Evaluation radiopharmacologique de traceurs TEP des synucléinopathies » Master Recherche Pharmacologie, Modélisation et Essais cliniques, Lyon 1

2010-11	Co-encadrement 50%	Afifa Slimen	« Exploitation d'un atlas cérébral numérique chez le rat pour l'analyse et la modélisation de données pré-cliniques en tomographie par émission de positons (TEP) » Master Recherche Ingénierie Biomédicale et Pharmaceutique, Lyon 1
---------	--------------------	--------------	--

DIRECTION DE THESEES D'EXERCICE DE PHARMACIE / DES DE PHARMACIE HOSPITALIERE

Depuis 2011 Direction de 5 thèses de Pharmacie
Direction de 4 thèses de DES Pharmacie Hospitalière (Radiopharmacie)

4.2. ENCADREMENT HOSPITALIER

Depuis 2007 Encadrement d'internes en pharmacie (1 à 2/an)
Encadrement d'étudiants de pharmacie en 5^{ème} année hospitalo-universitaire, filières pharmacien-ingénieur, internat et industrie (2 à 3/an)

5. RESPONSABILITES ET ACTIVITES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES ADMINISTRATIVES

5.1. RESPONSABILITES NATIONALES

Depuis 2016 Membre élue du **Conseil National des Universités 80^{ème} section** « Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé » et assessseure depuis 2019

Depuis 2022 Membre élue du **conseil d'Administration de la SoFRa** (Société Française de Radiopharmacie)
Membre et secrétaire du **conseil scientifique de la SoFRa**

Depuis 2022 **Coordonnatrice interrégionale du DES/DESC, option radiopharmacie** région AURA (Auvergne Rhône-Alpes)

5.2. RESPONSABILITES HOSPITALIERES

Depuis 2019	Responsable de la Radiopharmacie CERMEP , PUI Groupement Hospitalier Est (Dr Bréant), HCL Pilote processus Radiopharmacie CERMEP (certification ISO 9001)
2008-2012	Co-responsable UF de Radiopharmacie , Groupement Hospitalier Edouard Herriot, HCL

5.3. ACTIVITES D'INTERET COLLECTIF

Depuis 2017	Membre élue du Conseil d'administration de la faculté de Pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1 Membre nommée du Comité de prospective de la faculté de Pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1
Depuis 2021 et de 2016-18	Membre de la commission d'audition des candidats hospitalo-universitaires de la faculté de pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1 - HCL
2016-2022	Membre nommée du bureau de la commission hospitalo-universitaire de la faculté de pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1
2016-2018	Membre du bureau de la commission pédagogique de la faculté de pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1
Depuis 2020	Membre élue du Conseil de laboratoire du CERMEP Membre du CREX du CERMEP
Depuis 2013	Membre des commissions pédagogique, hospitalo-universitaire, scientifique de la faculté de pharmacie de Lyon, ISPB, Lyon1

5.4. RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES

RESPONSABILITES MASTER		
PERIODE	INTITULE FORMATION	COMPOSANTE
Depuis 2016	Master 1 « Sciences du Médicament et des Produits de Santé »	ISPB, Lyon1

RESPONSABILITES D'UE			
PERIODE	INTITULE UE	FORMATION	COMPOSANTE
Depuis 2019	Traceurs, explorations fonctionnelles et métaboliques	M1 « Parcours Initiation à la recherche Biomédicale »	Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon 1
Depuis 2016	Innovations hospitalières	M2 « Sciences du Médicament et des Produits de Santé » Parcours Innovation pharmaceutique et développement analytique	ISPB, Lyon1
2013-20	Certificat de Synthèse Pharmaceutique	DFASP1 (4 ^{ème} année)	ISPB, Lyon1
2013-19	Sciences analytiques	DFGSP2 (2 ^{ème} année)	ISPB, Lyon1
2013-2015	Innovations et technologies pharmaceutiques hospitalières	M2 « Sciences du Médicament » Parcours Innovation pharmaceutique et développement analytique	ISPB, Lyon1

5.5. ACTIVITES D'EXPERTISE

2008-2011 **Activité d'expertise** pour le Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA) Cellule réglementaire, Axe I Programme ProCan (Nanotechnologies, Imagerie et Cancer). Accompagnement réglementaire des porteurs de projet pour le passage des candidats médicaments de la paillasse à l'essai clinique.

6. ACTIVITES SCIENTIFIQUES

6.1. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

ARTICLES DANS DES REVUES INTERNATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE (IMPACT FACTOR ISI WEB OF KNOWLEDGE 2021)

1. Becker G, Debatisse J, Rivière M, Crola Da Silva C, Beaudoin-Gobert M, Eker OF, Wateau O, Cho TH, Wiart M, Léon Tremblay L, Nicolas Costes N, Inès Mérida I, Jérôme Redouté J, Léon C, Langlois JB, Le Bars D, **Lancelot S**, Nighoghossian N, Mechtouff L, Canet-Soulas E. Spatio-temporal characterization of brain inflammation in a non-human primate

- stroke model mimicking endovascular thrombectomy. *Neurotherapeutics*. 2023 Mar 28. doi: 10.1007/s13311-023-01368-2. (**IF = 6,088**)
2. Courault P*, **Lancelot S***, Costes N, Colom M, Le Bars D, Redoute J, Gobert F, Dailler F, Isal S, Jecker T, Newman-Tancredi A, Merida I, Zimmer L. [18F]F13640 as a PET radiopharmaceutical for functional 5-HT1A receptor imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023 Jan 19. doi: 10.1007/s00259-022-06103-1. (**IF = 9,236**)
 3. Dhelft F, **Lancelot S**, Mouton W, Le Bars D, Costes N, Roux E, Orkisz M, Benzerdjeb N, Richard JC, Bitker L. Prone position decreases acute lung inflammation measured by [11C](R)-PK11195 positron emission tomography in experimental acute respiratory distress syndrome. *J Appl Physiol* (1985). 2023 Feb 1;134(2):467-481. doi: 10.1152/jappphysiol.00234.2022. (**IF = 3,88**)
 4. Prange S, Metereau E, Maillet A, Klinger H, Schmitt E, Lhommée E, Bichon A, **Lancelot S**, Meoni S, Broussolle E, Castrioto A, Tremblay L, Krack P, Thobois S. Limbic Serotonergic Plasticity Contributes to the Compensation of Apathy in Early Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2022 Mar 3. doi: 10.1002/mds.28971. (**IF = 9,698**)
 5. Bitker L, Dhelft F, **Lancelot S**, Le Bars D, Costes N, Benzerdjeb N, Orkisz M, Richard JC. Non-invasive quantification of acute macrophagic lung inflammation with [11C](R)-PK11195 using a three-tissue compartment kinetic model in experimental acute respiratory distress syndrome. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022 Feb 7. doi: 10.1007/s00259-022-05713-z. (**IF = 10,057**)
 6. Mérida I, Jung J, Bouvard S, Le Bars D, **Lancelot S**, Lavenne F, Bouillot C, Redouté J, Hammers A, Costes N. CERMEP-IDB-MRXFDG: a database of 37 normal adult human brain [18F]FDG PET, T1 and FLAIR MRI, and CT images available for research. *EJNMMI Res*. 2021 Sep 16;11(1):91. doi: 10.1186/s13550-021-00830-6. (**IF = 3,434**)
 7. Laurencin C*, **Lancelot S***, Gobert F, Redouté J, Mérida I, Jecker T, Liger F, Irace Z, Greusard E, Lamberet L, Bars DL, Costes N, Ballanger B. Modeling [11C]yohimbine PET human brain kinetics with test-retest reliability, competition sensitivity studies and search for a suitable reference region. *Neuroimage*. 2021 Jul 2:118328. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118328. (**IF = 7,4**)
 8. Hosselet C, Peyronnet D, Lamballais M, Smadja C, Verrey AS, Tyranowicz S, Galvez D, Joyes P, Danguy des Deserts L, Félice K, **Lancelot S**. [Quality guidelines for radiopharmacy: Development of a risk-assessment tool]. *Ann Pharm Fr*. 2021 Jan 29:S0003-4509(21)00004-3. doi: 10.1016/j.pharma.2021.01.003.
 9. Courault P, Demarquay G, Zimmer L, **Lancelot S**. Cluster headache: State of the art of pharmacological treatments, and therapeutic perspectives. *Fundam Clin Pharmacol*. 2020 Dec 8. doi: 10.1111/fcp.12636. (**IF = 2,747**)
 10. Debatisse J, Wateau O, Cho TH, Costes N, Mérida I, Léon C, Langlois JB, Taborik F, Verset M, Portier K, Aggour M, Troalen T, Villien M, Makris N, Tourvieille C, Bars DL, **Lancelot S**, Confais J, Oudotte A, Nighoghossian N, Ovize M, Vivien D, Contamin H,

- Agin V, Canet-Soulas E, Eker OF. A non-human primate model of stroke reproducing endovascular thrombectomy and allowing long-term imaging and neurological read-outs. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021, 41:745-760. doi: 10.1177/0271678X20921310. **(IF = 6,597)**
11. Debatisse J, Eker OF, Wateau O, Cho TH, Wiart M, Ramonet D, Costes N, Mérida I, Léon C, Dia M, Paillard M, Confais J, Rossetti F, Langlois JB, Troalen T, Iecker T, Le Bars D, **Lancelot S**, Bouchier B, Lukaszewicz AC, Oudotte A, Nighoghossian N, Ovize M, Contamin H, Lux F, Tillement O, Canet-Soulas E. PET-MRI nanoparticles imaging of blood-brain barrier damage and modulation after stroke reperfusion. *Brain Communications*, Volume 2, Issue 2, 2020, fcaa193, <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa193> (nouvel Open access issu de Brain, pas encore d'IF)
 12. Courault P, Emery S, Bouvard S, Liger F, Chauveau F, Meyronet D, Fourier A, Billard T, Zimmer L, **Lancelot S**. Change in Expression of 5-HT6 Receptor at Different Stages of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study with the PET Radiopharmaceutical [18F]2FNQ1P. *J Alzheimers Dis.* 2020;75(4):1329-1338. doi: 10.3233/JAD-191278. **(IF = 4,16)**
 13. Emery S, Fieux S, Vidal B, Courault P, Bouvard S, Tourvieille C, Iecker T, Billard T, Zimmer L, **Lancelot S**. Preclinical validation of [18F]2FNQ1P as a specific PET radiotracer of 5-HT6 receptors in rat, pig, non-human primate and human brain tissue. *Nucl Med Biol.* 2020 Jan 22;82-83:57-63. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2020.01.006. **(IF = 2,947)**
 14. Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, **Lancelot S**. PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Jan;25:57-68. **(IF = 7,035)**
 15. Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Berthier L, Mendjel-Herda M, Cadarossanesaib F, Bouillot C, Iecker T, Terreux R, **Lancelot S**, Chauveau F, Billard T, Zimmer L. In Silico, in Vitro, and in Vivo Evaluation of New Candidates for α -Synuclein PET Imaging. *Mol Pharm.* 2018 Aug 6;15:3153-3166. **(IF = 5,364)**
 16. Verdurand M, Levigoureux E, **Lancelot S**, Zeinyeh W, Billard T, Quadrio I, Perret-Liaudet A, Zimmer L, Chauveau F. Amyloid-Beta Radiotracer [18F]BF-227 Does Not Bind to Cytoplasmic Glial Inclusions of Postmortem Multiple System Atrophy Brain Tissue. *Contrast Media Mol Imaging.* 2018 Feb 6;2018:9165458. doi: 10.1155/2018/9165458. **(IF = 3,009)**
 17. Thieulin C, Pailier-Mattei C, Vargiolua R, **Lancelot S**, Zahouani H. Study of the tactile perception of bathroom tissues: comparison between the sensory evaluation by a handfeel panel and a tribo-acoustic artificial finger. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017, 150:417-425. **(IF = 5,999)**
 18. **Lancelot S**, Giammarile F, Tescaru A. Paraneoplastic syndrome demonstrated on 99mTc-HMDP bone scan. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016, 43:2271-2272. **(IF = 10,057)**

19. Levigoureux E, **Lancelot S**, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchère J, Billard T, Baron T, Zimmer L. Binding of the PET radiotracer [¹⁸F]BF227 do not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr. Alzheimer Res.* 2014, 11:955-960. **(IF = 3,04)**
20. **Lancelot S**, Roche R, Slimen A, Bouillot C, Levigoureux E, Langlois JB, Zimmer L, Costes N. A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET activity. *PlosOne* 2014, 9:e109113. **(IF = 3,752)**
21. Bozzetto J, **Lancelot S**, Giammarile F. Chemotherapy-Related Gallbladder Visualization in a ^{99m}Tc-HMDP SPECT/CT Bone Scan. *Clin Nucl Med* 2013, 38:829-831. **(IF = 10,782)**
22. Lemoine L, Becker G, Vacher B, Billard T, **Lancelot S**, Newman-Tancredi A, Luc Zimmer L. Radiosynthesis and preclinical evaluation of 18F-F13714 as a fluorinated 5-HT1a receptor agonist radioligand for pet neuroimaging. *J Nucl Med* 2012, 53:969-976. **(IF = 11,082)**
23. **Lancelot S**, Zimmer L. Small animal Positron Emission Tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2010, 31:411-417. **(IF = 17,638)**
24. **Lancelot S**, Guillet B, Sigrist S, Bourrelly M, Waultier S, Mundler O, Pisano P. Radiation exposure of medical personnel during metabolic radiotherapy practices. *Nucl Med Commun* 2008, 29:405-410. **(IF = 1,698)**
25. Chinot O, Barrié M, Fuentes S, Eudes N, **Lancelot S**, Metellus P, Muracciole X, Braguer D, Ouafik LH, Martin PM, Dufour H, Figarella-Branger D. Correlation Between O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase and Survival in Inoperable Newly Diagnosed Glioblastoma Patients Treated With Neoadjuvant Temozolomide. *J Clin Oncol* 2007, 25:1470-1475. **(IF = 50,739)**
26. Watkins JD, **Lancelot S**, Campbell GC, Esquieu D, de Mareuil J, Opi S, Annappa S, Salles JP and Loret EP. Reservoir Cells no longer Detectable after a Heterologous SHIV Challenge with the Synthetic HIV-1 Tat Oyi Vaccine. *Retrovirology* 2006, 3:8. doi: 10.1186/1742-4690-3-8. **(IF = 3,768)**
27. de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, **Lancelot S**, Opi S, Esquieu D, Watkins JD, Prevot C, Braguer D, Peyrot V, Loret EP. HIV-1 Tat protein enhances Microtubule polymerization. *Retrovirology* 2005, 2:5. doi: 10.1186/1742-4690-2-5. **(IF = 3,768)**

En cours de soumission/révision :

- Courault P, Bouvard S, Bouillot C, Bolbos R, Iecker T, Billard T, Zimmer L, Chauveau F, **Lancelot S**. Influence of Obesity on Brain 5-HT6 Receptor Expression: an In-Vivo Study with the PET Radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P. En cours de révision dans *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*

- Chalet L, Debatisse J, Wateau O, Boutelier T, Wiart M, Costes N, Merida I, Redouté J, Langlois L, **Lancelot S**, Léon C, Cho TH, Mechtouff L, Eker OF, Nighoghossian N, Canet-Soulas E, Becker G. PREMISE: A database of 20 *Macaca Fascicularis* PET/MRI brain imaging available for research. En cours de révision dans *LabAnimal*

- Debatisse J, Eker OF, Cho TH, Becker G, Wateau O, Wiart M, Costes N, Mérida I, Léon C, Langlois JB, Le Bars D, **Lancelot S**, Lux F, Chalet L, Boutelier T, Nighoghossian N, Mechtouff L, Canet-Soulas E. Multiparametric PET-MRI characterization of the no-reflow phenomenon in a pre-clinical stroke model. En cours de révision dans Investigative Radiology
- Courault P, Zimmer L, **Lancelot S**. Toward Functional PET Imaging of Spinal Cord. En cours de soumission dans European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
- Laurencin C, **Lancelot S**, Merida I, Costes N, Redouté J, Le Bars D, Boulinguez P, Ballanger B. Distribution of $\alpha 2$ -adrenergic receptors in the living human brain using $[^{11}\text{C}]$ yohimbine PET En cours de révision dans Biomolecules

ARTICLES DANS DES REVUES NATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE

1. Loiseaux MN, **Lancelot S**, Schwan R, Plazonnet MP, Llorca PM. La Transferrine Hyposialylée ou CDT (Carbohydrate Deficient Transferrin) et le %CDT. Expérience Clermontoise de ce Marqueur de l'Alcoolisme. L'Eurobiologiste 2003, 263.
2. **Lancelot S**, Micallef J, Blin O. Conséquences Cliniques de la Salification des Principes Actifs et des Excipients. La Lettre du Pharmacologue 2003, 17, 4.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX

1. Ballanger B, Laurencin C, **Lancelot S**, Gobert F, Iecker T, Bonnefoi F, Irace Z, Mérida I, Redouté J, Debatisse J, Le Bars D, Costes N. Test-retest and $\alpha 2$ -receptor challenge with $[^{11}\text{C}]$ Yohimbine with search for a suitable reference region. XIII International Symposium of Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain - Mapping NeuroReceptors at Work (NRM 2021), December 14-16, 2021 digital.
2. P, Emery S, Bouvard S, Liger F, Chauveau F, Meyronet D, Fourier A, Billard T, Zimmer L, **Lancelot S**. Change In Expression Of 5-HT₆ Receptor At Different Stages Of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study With The Pet Radiopharmaceutical $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ}1\text{P}$. 4th Nuclear Technologies for Health Symposium (NTHS 2020), February 13-14, 2020 - Nantes, France.
3. Debatisse J, Eker OF, Wateau O, Cho TH, Wiart M, Costes N, Mérida I, Léon C, Langlois JB, Troalen T, Tourvieille C, Bonnefoi F, Iecker T, Le Bars D, **Lancelot S**, Bouchier B, Lukaszewicz AC, Nighoghossian N, Ovize M, Contamin H, Lux F, Tillement O, Canet-Soulas E. Characterization of tissue evolution in a non-human primate (NHP) model of cerebral ischemia-reperfusion (CIR) 15th European Molecular Imaging Meeting. March 24-27, 2020 - Thessaloniki, Greece.
4. Emery S, Fieux S, Vidal B, Liger F, Thierry Billard T, Pierre Courault P, Bouvard S, Luc Zimmer L, **Lancelot S**. Preclinical validation of $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ}1\text{P}$, a specific PET radiotracer of 5-HT₆ receptors in rat, pig, non-human primate and human brain tissues. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2019. October 12-16, 2019 - Barcelona, Spain.
5. Levigoureux E, Zeinyeh W, Billard T, Chauveau F, Verdurand M, Zimmer L, **Lancelot S**. Evaluation of two new radiotracers for alpha synuclein PET imaging. Annual Congress

- of the European Association of Nuclear Medicine, 2016. October 15-19, 2016 - Barcelona, Spain.
6. Levigoureux E, Bouillot C, Verdurand M, Chauveau F, Billard T, Zimmer L, **Lancelot S**. Metabolic study in a transgenic A53T synuclein mouse model based on [¹⁸F]FDG and serotonergic neurotransmission imaging. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2015. October 10-14, 2015 - Hamburg, Germany.
 7. Odouard E, Tescaru A, Giammarile F, Bournaud C, **Lancelot S**. Determinants of sentinel node localization failure in gynaecological cancers: a retrospective cohort study. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2015. October 10-14, 2015 - Hamburg, Germany.
 8. Levigoureux E, **Lancelot S**, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchère J, Billard T, Baron T, Zimmer L. Binding of the PET Tracer [¹⁸F]BF227 do not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice brain. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2014. October 18-22, 2014 – Gothenburg, Sweden.
 9. CO.8 Blin O, **Lancelot S**. Le choix d'un traitement antidépresseur au long cours. 1ères Rencontres Franco-Marocaines, Saint Paul de Vence (France), 20-23 mars 2003.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES NATIONAUX

1. Chauveau F, Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Cadarossanesaib F, Bouillot C, Zimmer L, **Lancelot S**, Billard T. Screening and evaluation of new radioligands for alpha-synuclein PET imaging. Congrès de la Section 28 du Comité National de la Recherche Scientifique. Pharmacologie, bio-ingénierie, imagerie, biotechnologie, Bordeaux, 2-3 juin 2016.
2. **Lancelot S**, Hammers A, Langlois JB, Bouillot C, Zimmer L, Costes N. A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET kinetics. Nouvelles méthodologies en imagerie du vivant, Lyon, 11-13 décembre 2012.
3. **Lancelot S**, Slimen A, Sahakian AC, Levigoureux E, Langlois JB, Zimmer L, Costes N. Un atlas probabiliste pour la neuroimagerie du cerveau de rat : développement et évaluation. 1^{er} congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine, Marseille, 21-23 mars 2012.
4. Lemoine L, Andries J, Le Bars D, **Lancelot S**, Billard T, Zimmer L. Vers l'imagerie moléculaire des récepteurs serotonergiques 5-HT₇. Journées Thématiques GDR « Imageries in vivo », Marseille, 2010.
5. Huot L, **Lancelot S**, Descotes J. Cellule réglementaire de la Filière Nanotraceurs. 4^{èmes} Journées Scientifiques du CLARA, Archamps, 24-25 mars 2009.
6. **Lancelot S**, Carre AL, Coillot C, Oberti C, Bourrelly M, Waultier S, Giraud F, Mundler O, Guillet B, Pisano P. Estimation de l'exposition du personnel au cours des radiothérapies métaboliques : lipiodol-iode 131, samarium 153 et synoviorthèses à l'yttrium 90. 44^{ème} Colloque de Médecine Nucléaire de Langue Française, 9-12 septembre 2006, Angers. Abstract dans Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique, 30, 508, 2006

COMMUNICATIONS ECRITES A DES CONGRES INTERNATIONAUX

1. Courault P, Costes N, Redoute J, Zimme L, Merida I, **Lancelot S**. Simplified Use of [18F]F13640 for Functional 5-HT1A Receptor Exploration: From PET Dynamic Measures to Statics Acquisition. 18th European Molecular Imaging Meeting (EMIM 2023), March 14-17, 2023 - Salzburg, Austria.
2. Chalet L, Boutelier T, Christen T, Debatisse J, Wateau O, Costes N, Merida I, **Lancelot S**, Léon C, Nighoghossian N, Berthezene Y, Eker OF, Cho TH, Mechtouff L, Canet-Soulas E. Translational MRI oxygen metabolism validated by PET-MRI for ischemic stroke. 18th European Molecular Imaging Meeting (EMIM 2023), March 14-17, 2023 - Salzburg, Austria.
3. Chalet L, Debatisse J, Eker OF, Wateau O, Cho TH, Wiart M, Costes N, Merida I, Léon C, Langlois JB, **Lancelot S**, Nighoghossian N, Mechtouff L, Canet-Soulas E, Guillaume Becker G. Multimodal PET-MRI database for collaborative translational research on Macaca Fascicularis. 18th European Molecular Imaging Meeting (EMIM 2023), March 14-17, 2023 - Salzburg, Austria.
4. Courault P, **Lancelot S**, Costes N, Le Bars D, Redoute J, Gobert F, Dailier F, Isal S, Newman-Tancredi A, Merida I, Zimmer L. Selective agonist PET radioligand [18F]F13640 for functional 5-HT1A receptor imaging in humans. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2022. October 15-19, 2022 - Barcelona, Spain. **Poster commenté**
5. Courault P, Bouvard S, Bouillot C, Bolbos R, Iecker T, Billard T, Zimmer Z, Chauveau F, **Lancelot S**. Influence of Obesity on Brain 5-HT6 Receptor Expression: an In-Vivo Study with the PET Radiotracer [18F]2FNQ1P. 17th European Molecular Imaging Meeting (EMIM 2022). 15-18 March 2022, Thessaloniki, Greece. **Poster commenté**
6. Debatisse J, Eker O, Wateau O, Costes N, Mérida I, Verset M, Oudotte A, Lukaszewicz AC, Langlois JB, Leon C, Augeul L, **Lancelot S**, Le Bars D, Troalen T, Contamin H, Cho TH, Canet-Soulas E. Comparison of perfusion MRI parameters to best identify PET penumbra and final infarct: a PET/MRI simultaneous study in a stroke model. Brain & Brain PET congress, 2019. July 4-7, Yokohama, Japan.
7. Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, **Lancelot S**. Dopaminergic, serotonergic and glucose metabolism disorders at early stage of disease in accelerated mouse model of synucleinopathy. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2017. October 21-25, 2017 - Vienna, Austria.
8. Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Cadarossanesaib F, Bouillot C, Iecker T, Berthier L, Terreux R, **Lancelot S**, Chauveau F, Billard T, Zimmer L (2017). Evaluation of new benzoxazole-based radioligands as alpha-synuclein PET radiotracers. 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases (AD/PD), March 29 – April 2, 2017, Vienna, Austria.
9. Chauveau F, **Lancelot S**, Levigoureux E, Alazet S, Cadarossanesaib F, Quadrio I, Perret-Liaudet A, Billard T, Zimmer L, Verdurand M (2017). Does amyloid radiotracer [18F]BF-227 bind to cytoplasmic glial inclusions? 13th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases (AD/PD), March 29 – April 2, 2017, Vienna, Austria.

10. Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Cadarossanesaib F, Bouillot C, Zimmer L, **Lancelot S**, Billard T, Chauveau F. Evaluation of new benzoxazole-based radioligands as alpha-synuclein radiotracers. European Molecular Imaging Meeting (EMIM), March 8-10, 2016, Utrecht, Netherlands.
11. Verdurand M, Mendjel M, Levigoureux E, **Lancelot S**, Billard T, Zimmer L Chauveau F. A screening assay in the search of an α -synuclein PET radioligand: an update. World Molecular Imaging Congress (WMIC), September 2-5, 2015, Honolulu, USA.
12. Verdurand M, Mendjel M, Levigoureux E, **Lancelot S**, Billard T, Zimmer L Chauveau F. A screening assay in the search of an alpha-synuclein PET radioligand. 10th annual meeting of the European Society for Molecular Imaging (ESMI) – European Molecular Imaging Meeting (EMIM), March 18-20, 2015 - Tubingen, Germany.
13. Chauveau F, Verdurand M, Ong E, Levigoureux E, **Lancelot S**, Billard T, Zimmer L. Amyloid-beta₁₋₄₀ fibril polymorphism: impact on biostability and [¹⁸F]AV-45 binding. 9th annual meeting of the European Society for Molecular Imaging (ESMI) – European Molecular Imaging Meeting (EMIM), June 4-5, 2014 - Antwerp, Belgium.
14. Kryza D, Kerneur N, Lemonnier F, Agostini D, **Lancelot S**, Peyronnet D. Simplified method for the determination of ^{99m}Tc-L,L-ethylenedicysteine radiochemical purity. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2012. October 27-31, 2012 - Milan, Italy.
15. **Lancelot S**, Hammers A, Slimen A, Sahakian AC, Levigoureux E, Bouillot C, Langlois JB, Zimmer L, Costes N. A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET kinetics. The 9th International Symposium on Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain 2012. August 9-11, 2012. Baltimore, USA.
16. Levigoureux E, Bolot C, **Lancelot S**, Aulagner G, Pina-Jomir G. Value of radionuclide cisternography in the diagnosis of a cerebrospinal fluid leak, a case report. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2011. October 15-19, 2011 - Birmingham, UK.
17. **Lancelot S**, Costes N, Lemoine L, Zimmer L. Development and evaluation of a digital atlas for PET neuroimaging in domestic cat (*Felis catus*). Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2010. October 9-13, 2010 - Vienna, Austria. Abstract in *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37, S387, 2010.
18. Huot L, **Lancelot S**, Descotes J, Lobo Luppi L, Janier M. Regulatory issues related to clinical transfer: assistance unit for innovative nano-medicines. Clinical Applications of Nanotechnologies in the Field of Cancer, Montpellier, January 28-29, 2010.
19. **Lancelot S**, Guillet B, Sigrist S, Coillot C, Carre A, Giraud F, Bourrelly M, Mundler O, Pisano P. Evaluation of medical staff exposure in metabolic radiation therapy practices with ¹³¹I labelled lipiodol, ⁹⁰Y-colloid and ¹⁵³Sm EDTM. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. October 13-17, 2007 - Copenhagen, Denmark. Abstract in *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, S360, 2007.

COMMUNICATIONS ECRITES A DES CONGRES NATIONAUX

1. Blondeel-Gomes S, Ancedy D, Brunet MD, Peyronnet D, Paty LP, Joyes P, Eychenie H et *groupe de travail : Ardisson V, Chabanse A, Clotagatide A, Debordeaux D, Felice K, Lamesa C, **Lancelot S**, Lao S. Autodiag en radiopharmacie. 18èmes Rencontres Convergences Santé Hôpital, Troyes, 19 au 22 septembre 2023.
2. Courault P, Bouvard S, Bouillot C, **Lancelot S**, Luc Zimmer L. Influence of stress on [18F]F13640 binding, a 5-HT1A receptor agonist used as a PET radiopharmaceutical SFPT Société Française de Pharmacologie Lille 2022
3. Ponchon A, Stamm C, Bolot C, Fraysse M, **Lancelot S**. Création et validation d'un outil d'analyse des risques liés à la prise en charge médicamenteuse en radiopharmacie et médecine nucléaire. 8èmes Rencontres Convergences Santé Hôpital, Marseille, 18-20 septembre 2013.
4. Kerneur N, Kryza D, Lemonnier F, Peyronnet D, Hecquard C, **Lancelot S**. 99mTc-EDICIS : mise au point et validation d'une technique rapide de détermination de pureté radiochimique. Congrès SNRPH/SNPHPU, Ajaccio, 19-21 septembre 2012.
5. Levigoureux E, Valley D, Pivot C, **Lancelot S**, Kryza D. Détermination de la pureté radiochimique de médicaments radiopharmaceutiques par radio UHPLC. Congrès SNRPH/SNPHPU, Tours, 21-23 septembre 2011.
6. Levigoureux E, Valley D, Vernoux K, Roux P, Gaillard D, Pivot C, **Lancelot S**, Kryza D. Adsorption d l'acide dimercaptosucinique technétié (99mTc-DMSA) aux parois des seringues : évaluation de la situation et mise en place d'actions correctrices. Hopipharm, Nantes, 24-27 mai 2011.
7. Huot L, **Lancelot S**, Descotes J, Berger F, Janier M, Chapuis F. Soutien au Développement des Innovations en Nanotechnologies : mise en place d'une cellule d'accompagnement réglementaire par le Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA). Société Française de Santé Publique, SFSP, "La nouvelle gouvernance en santé", Nantes, 1-3 octobre 2009.
8. **Lancelot S**, Carre AL, Coillot C, Oberti C, Bourrelly M, Waultier S, Giraud F, Mundler O, Guillet B, Pisano P. Estimation de l'exposition du personnel au cours des radiothérapies métaboliques : lipiodol-iode 131, samarium 153 et synoviorthèses à l'yttrium 90. 22ème Journées Nationales d'Information des Pharmaciens Hospitaliers, 12ème Ateliers SNPHPU - SNRPH, Strasbourg, 13-15 septembre 2006.
9. Taieb D, **Lancelot S**, Guillet B, Lussato D, Pisano P, Mundler O. Interaction d'une prophylaxie antimalarique et d'une substitution par Lévothyroxine pour cancer de la thyroïde. 43ème Colloque de Médecine Nucléaire de Langue Française, Marseille, 19-22 novembre 2005. Abstract dans Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique, 29, 732, 2005.
10. **Lancelot S**, Boubekour N, Michel G, Gauthier L. Aspergillose (cas clinique). ESCP, Paris, 27 avril 2004.
11. **Lancelot S**, Ruivard M, Philippe P, Chopineau J. Analyse des prescriptions d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses sur une période de 6 ans au CHU de Clermont-Ferrand. 4ème Forum AAQTE, Nancy, 26 et 27 novembre 2002. Abstract dans Le Pharmacien Hospitalier S154, 38, 2003.

PRODUCTION PROFESSIONNELLE

2021-2022 Membre d'un GT en collaboration avec l'Agence Nationale d'Appui à la Performance des établissements de santé et médico-sociaux (ANAP)

Production scientifique GT ANAP :

- **De 11 fiches pratiques** dédiées à l'activité de radiopharmacie (équipement, gouvernance, management et RH, support, organisation interne)
<https://anap.fr/s/article/pharma-bio-ste-publication-2868>
- **D'un outil d'autodiagnostic** pour l'évaluation de l'activité de radiopharmacie
<https://anap.fr/s/article/pharma-bio-ste-publication-2867>

6.2. ANALYSE BIBLIOMETRIQUE

N° ORCID : 0000-0002-3637-8035

Index H 12 (Google Scholar consulté le 16 avril 2023)

Nombre total de citations : 746

6.3. CONFERENCES SUR INVITATION

1. **Lancelot S.** Etude de 1ère administration chez l'homme du [¹⁸F]F13640, nouveau médicament radiopharmaceutique TEP des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. Radiopharmaciens du Sud-Est, 10 juin 2022, Marseille.
2. **Lancelot S.** Référentiel qualité en radiopharmacie : création d'un outil d'analyse des risques. 10èmes eRDV de la SOFRA (Société Française de Radiopharmacie), 18 et 19 novembre 2021.
3. **Lancelot S,** Le Bars D. Apports de l'imagerie PET/CT ET PET/IRM. Les rencontres lyonnaises de cardiologie, 24 et 25 juin 2021, Lyon.
4. Sarah Chaïb, **Lancelot S.** Réunions régionales de Médecine Nucléaire, Saint Etienne, 6 avril 2019.
5. **Lancelot S.** Thérapie ciblée par radionucléides ou radiothérapie interne vectorisée. INSTN 22 janvier 2018.
6. **Lancelot S.** Radiopharmacie et partenariat public-privé. 11èmes Rencontres Convergences Santé Hôpital, Avignon, 28-30 septembre 2016.
7. **Lancelot S.** Aspects réglementaires de l'utilisation des radiopharmaceutiques marqués au gallium 68. Enseignement post-universitaire pour les médecins nucléaires région AURA, 24 novembre 2011.
8. **Lancelot S.** Evaluation réglementaire des traceurs et produits de contraste en imagerie. Cycle d'initiation eu Développement Réglementaire d'un candidat médicament (CIDREM), Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), 11 octobre 2011.
9. **Lancelot S.** Particularités du dossier qualité d'un anticorps monoclonal. Cycle d'initiation eu Développement Réglementaire d'un candidat médicament (CIDREM), Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), 9 février 2010.

10. **Lancelot S.** Démarche qualité et nano-objets. Partie II. Cycle Développement d'un agent biologique de la paille à l'homme, aspects réglementaires, Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), 4 juin 2009.
11. **Lancelot S.** Démarche qualité et nano-objets. Partie I. Cycle Développement d'un agent biologique de la paille à l'homme, aspects réglementaires, Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), 27 février 2009.

6.4. VALORISATION

Licence d'exploitation (atlas cérébral de rat)

Costes N, **Lancelot S**, Slimen A, Levigoureux E, Bouillot C, Langlois JB. **Maximum probability brain atlas based on manually drawn atlases from 7 Sprague-Dawley rats** (with 29 regions each) (the "Atlas"), with a list of regions (together the "Materials")

Licence diffusée à une quinzaine de centres d'imagerie petit animal internationaux

6.5. ACTIVITES D'EXPERTISE

Expertise pour le Cancéropole PACA, AAP « Emergence » 2019

6.6. ACTIVITE EDITORIALE

Reviewer pour les journaux internationaux : Clinical Pharmacokinetics (2016), The Journal of Nuclear Medicine Technology (2020), Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (2020), Frontiers in nutrition (2021), Pharmaceuticals (2021)

2023 Reviewer congrès EMIM 2023

Reviewer 12èmes RDV de la SOFRA, Paris 8-9 juin 2023

6.7. PARTICIPATION A L'ORGANISATION DE COLLOQUES/CONGRES

Membre du comité scientifique d'organisation des 12èmes RDV de la SOFRA, Paris 8-9 juin 2023

Membre du comité scientifique d'organisation des 11èmes eRDV de la SOFRA, 18 novembre 2022

Membre du comité scientifique d'organisation du congrès national SNPHPU, Avignon 2016

6.8. PARTICIPATION A DES SOCIETES SAVANTES NATIONALES/INTERNATIONALES ET RESEAUX DE RECHERCHE

- Depuis 2021 **Membre des GT de la SoFRA** : Essais Cliniques, Neurologie, Théranostique, Préclinique
- Depuis 2019 **Membre de l'European Association of Nuclear Medicine**

Le CERMEP et/ou l'équipe BIORAN est par ailleurs :

- **Membre du Groupement d'intérêt Scientifique (GIS) Club Français des Radiopharmaceutiques.** GIS qui regroupe plus de 20 laboratoires de recherche français travaillant dans le domaine de la synthèse, du marquage et de l'étude du devenir biologique de nouveaux médicaments radioactifs à visée diagnostique et/ou thérapeutique pour la médecine nucléaire.
- **Membre du Laboratoire d'Excellence (LABEX) PRIMES (Physics, Radiobiology, Medical Imaging and Simulation)** qui regroupe 16 laboratoires de recherche de la région Rhône-Alpes Auvergne (Lyon, Grenoble et Clermont-Ferrand). Il s'agit d'un projet multidisciplinaire qui vise à développer de nouveaux concepts et méthodes en radiothérapie, imagerie et en radiobiologie. Il est ciblé sur l'exploration, le diagnostic et la thérapie des cancers et des pathologies du vieillissement.
- **Membre du GDR 2037 – AIM "Agents d'Imagerie Moléculaire" fédère les groupes de recherche français développant des outils de chimie pour l'imagerie (2018-2023).** Leurs compétences complémentaires devraient permettre d'identifier et de lever les verrous et défis scientifiques pour aider au développement de sondes d'imagerie moléculaire et théranostiques pour des applications en imagerie optique, nucléaire et par résonance magnétique afin de (i) faciliter un diagnostic précoce, de caractériser la progression de la maladie, d'évaluer l'efficacité du traitement en clinique et (ii) de mettre des outils d'investigation à la disposition de la recherche biomédicale.
- **Membre de France Life Imaging (FLI).** FLI, lauréat de l'appel à projet Investissements d'Avenir « Infrastructure en Biologie et Santé », a été créé en 2012 pour promouvoir les technologies innovantes en imagerie biomédicale ainsi que les services associés, et en faciliter l'accès pour tous les partenaires académiques et industriels. Ce réseau harmonisé en imagerie biomédicale est piloté par le CEA.

4.1. JURY THESES DE SCIENCES

- 2018** Benjamin PORET, « Développement d'analogues urotensinergiques radiomarqués pour l'imagerie de tumeurs solides. » Normandie Université.

- 2020** Anne-Sophie NAVARRO, « Développement de nouveaux radiopharmaceutiques à base de cuivre-64 pour application théranostique en cancérologie. » Université de Nantes.
- 2020** Justine DEBATISSE, « Modélisation cinétique de la perméabilité vasculaire et de l'inflammation dans l'accident vasculaire cérébral via l'imagerie dynamique simultanée TEP/IRM. » Université Lyon1.

4.2. PARTICIPATION A DES COMITES DE SELECTION

- 2012** Poste 86 MCF 496 Physiologie-Pharmacologie, UFR Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II
- 2016** Poste 86 MCF 432 Physiologie-Pharmacologie, UFR Pharmacie de Marseille, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II,
- 2017** Poste 85 MCF 0336 « Chimie Analytique Pharmaceutique » ISPB, Université Claude Bernard Lyon1

4.3. CONTRATS DE RECHERCHE ET FINANCEMENTS

Comme co-investigateur

Nom du projet	Nom de l'AAP et organisme financeur	Nom du porteur du projet	Rôle dans le projet	Financement obtenu
ROSBEF - Role of the serotonin system in behavioral changes in frontotemporal degeneration	Fondation Alzheimer AAP 2022	Maïté FORMAGLIO, Sophie LANCELOT	Responsable scientifique Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]altansérine et [¹¹ C]DASB	100 k€
Acquisition d'un nouvel automate de synthèse carbone 11	AAP 2022 « Equipement de recherche », Université Lyon1	Luc ZIMMER, Sophie LANCELOT, Didier LE BARS	Utilisateur	150 k€
F13640-AVF - Algie vasculaire de la face	APICIL 2019 AAP SFR Santé Lyon Est 2022 AAP Projet AVF 2022 de la Société Française d'Etudes des Migraines et Céphalées	Luc ZIMMER, Sophie LANCELOT	Responsable scientifique Responsable DME, production/validation du [¹⁸ F]F13640	20 k€ 5 k€ 5 k€
In vivo mapping of α 2-adrenoceptors in the non-human primate brain with ¹¹ C-Yohimbine.	AAP CRNL 2016	Bénédicte BALLANGER, Sophie LANCELOT	Responsable scientifique Responsable production de la [¹¹ C]yohimbine	10 k€
Cellule Réglementaire	Projet structurant « Axe I ProCan – Nanotechnologies, Imagerie et Cancer » du Cancéropôle Auvergne Rhône-Alpes (CLARA) (2008-2011)	Jacques DESCOTES Laure HUOT Marc JANIER Sophie LANCELOT	Responsable scientifique	70 k€

Comme partenaire

Nom du projet	Nom de l'AAP et organisme financeur	Nom du porteur du projet	Rôle dans le projet	Financement obtenu
INFLANET - A French Network for PET imaging of neuroinflammation in MS	ARSEP Emergence 2022	Bruno STANKOFF	Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]DPA-714	450 k€
CMRO2 : "Oxygen metabolism by MRI in clinical stroke: Innovative biomarker in cerebrovascular diseases"	ANR 2021	Tae-Hee CHO	Responsable DME, production/validation de [¹⁵ O]H ₂ O	965 k€
FoodAvoid -BrainCircuits	ANR 2021	Léon TREMBLAY	Responsable production de [¹⁵ O]H ₂ O et [¹⁸ F]2FNQ1P	200 k€
Laboratoire commun NI2D « Neuroimaging for Drug Discovery » qui associe le CRNL, la société pharmaceutique Theranexus et le CERMEP Objectif : développement de la gliopharmacologie au moyen d'outils d'imagerie précliniques	ANR Labcom 2020 Région - Pack Ambition Recherche	Luc ZIMMER	Responsable synthèses radiopharmaceutiques et évaluation préclinique (pharmacologie et microTEP)	
Hybrid-MRI - Complexes hybrides polyioniques pour l'imagerie médicale	ANR PRC 2019	Jean-Daniel MARTY	Développement et synthèse des [⁶⁸ Ga]HPICs, évaluation préclinique	377 k€
Myelin-Imaging - PET-MR imaging of an animal model of multiple sclerosis: evaluation of new radiotracers for myelin	ANR Jeune Chercheur 2018	Fabien CHAUVEAU	Responsable production de synthèse des radiotraceurs	283 k€
F13640-FIM Etude de première administration du F13640 chez l'homme (first in man)	France Life Imaging (FLI) 2016 Thellie 2018	Luc ZIMMER	Responsable DME, production/validation du [¹⁸ F]F13640	20 k€ 17 k€
SEROSIX Toward PET molecular imaging of 5-HT ₆ receptors during Alzheimer's Disease	Fondation Plan Alzheimer 2016	Luc Zimmer	Evaluation préclinique (pharmacologie et microTEP)	146 k€

Comme participant

Nom du projet	Nom de l'AAP et organisme financeur	Nom du porteur du projet	Rôle dans le projet	Financement obtenu
SeroDRAVET - Relation between serotonergic brainstem dysfunction and epilepsy-related respiratory dysfunction in Dravet syndrome	ANR AAP2021	Sylvain RHEIMS	Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]MPPF	500 k€
STICOG - (tDCS) comme traitement du déficit cognitif chez les sujets atteints de schizophrénie débutante	PHRC-I 2021	Clément DONDE, Jérôme BRUNELIN	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]flumazénil	250 k€
PARK-5HT4 - Expression du récepteur sérotoninergique 5-HT ₄ dans la maladie de Parkinson	AO France Parkinson 2020	Véronique SGAMBATO, Jing XIE	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]SB207145	60 k€
SEVIALANO - Serotonin modulation of Cortical-Basal Ganglia circuits involved in food intake and Anxiety in Anorexic patients	ANR 2020 et 2021 Fondation de France	Bogdan GALUSCA	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]DASB	140 k€
PRODROMAL PD Atteinte du système sérotoninergique pendant la phase prodromale de la maladie de Parkinson	ANR PRC 2020	Véronique SGAMBATO	Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]SB207145 et [¹¹ C]DASB	690 k€
NEUROTRANSMISSION - Lésion corticales sélective : cartographier les sites de liaison des récepteurs GABAA et 5-HT _{1A}	ANR 2020	Michel DESMURGET	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]flumazénil et [¹¹ C]DASB	510 k€
STATEMENT - Advanced simultaneous carotid/brain PET-MRI	ERA-NET NEURON 2019	Stefano FUMAGALLI, Laura MECHTOUFF	Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]DPA714	600 k€
ARITEP - Rôle de la sérotonine dans les symptômes psychiatriques du Gilles de la Tourette et du Parkinson	FRM	Stéphane THOBOIS, Benjamin Pasquereau, Yulia WORBE	Responsable DME, production/validation de [¹⁸ F]altansérine	30 k€
EV-NIRT - Illumination endo ventriculaire dans le proche IR à visée neuro protectrice dans la maladie de Parkinson	Clinatéc (mécénat)	Stephan CHABARDES, Stéphane THOBOIS	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]PE2I	70 k€
DUAL-TRACER - Traitement et Analyse en Imagerie Multimodale - Imagerie TEP bi-traceurs	FLI WP4 2019 France Life Imaging (FLI)	Thomas CARLIER, Nicolas COSTES	Production de [¹¹ C]acétate, [¹⁸ F]NaF	24 k€

PARTIE 1 : TITRES ET TRAVAUX

PK-HIDRA - Impact de l'hyperinflation cyclique sur l'inflammation pulmonaire au cours du syndrome de détresse respiratoire expérimental	AO JC HCL 2019	Jean-Christophe RICHARD, Laurent BITKER	Production de [¹¹ C]PK11195 Analyse des métabolites	30 k€
TRIAD - Récompense, dopamine et différences individuelles dans l'addiction au jeu	ANR JCJC 2019	Guillaume SESCOUSSE	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]raclopride	218 k€
5-HT6-BEHAVIORS	Fondation de France 2019	Léon TREMBLAY	Production de [¹⁸ F]2FNQ1P	42 k€
TI-TFCE Tumeurs fosse postérieure de l'enfant	AAP JC HCL Fondation HCL 2019	Pierre-Aurélien BEURIAT	Responsable DME, production/validation de [¹¹ C]méthionine	30 k€ 21,5 k€
MODIF-MS A phase 2 trial Design assessing Repurposed Remyelinating Agents in Multiple Sclerosis	PHRC 2019	Bruno STANKOFF	Fourniture médicament [¹⁸ F]florbetapir	1,2 M€
DREADDS - Clozapine for chemogenetics: Behavioural and pharmacological characterisation in a primate model of impulsivity	Fondation Neurodis 2018	Charlie WILSON	Développement et production de [¹¹ C]clozapine et [¹¹ C]deschloroclozapine	20 k€
5-HT6-BEHAVIORS	Fondation de France	Léon TREMBLAY	Production [¹⁸ F]2FNQ1P	42 k€
EATING-CIRCUIT2	Fondation Neurodis 2017	Léon TREMBLAY	Production de [¹⁵ O]H ₂ O, [¹⁸ F]2FNQ1P, [¹⁸ F]FDG	48 k€
INSyst 2016, 2 études 2NAR-Yohimbine (NCT03520543) et NA_TEP/IRM	ANR JCJC 2016 France Parkinson 2018	Bénédicte BALLANGER Chloé LAURENCIN	Développement, DME et production de [¹¹ C]yohimbine	331 k€ 50 k€
PARK-IMPULSE - Parkinson	Fondation Neurodis AO France Parkinson 2017	Stéphane THOBOIS	Responsable DME, production/validation [¹⁸ F]altansérine, [¹¹ C]DASB Analyse de métabolites	35 k€
PERFUSE	RHU 2017, ANR	Sébastien CROUZET	Fourniture médicament [⁶⁸ Ga]PSMA	8 M€
TIGRE - Diagnosis of pseudo-progression in glioblastoma patients treated with temozolomide radiochemotherapy	AO Fondation Neurodis	François DUCRAY	DME et production de [¹¹ C]méthionine	71 k€
CICLO-SAAR - Préconditionnement à la cicloprineA avant dilatation d'une sténose de l'artère rénale	AAP JC HCL	Sandrine LEMOINE / Gabrielle NORMAND	DME et production du [¹¹ C]acétate et [¹⁵ O]H ₂ O	30 k€

PARTIE II : ACTIVITES DE RECHERCHE

1. ACTIVITES DE RECHERCHE POST DOCTORALE

L'équipe BIORAN est dédiée à la recherche et au développement de nouveaux biomarqueurs cérébraux pour l'exploration de pathologies neurologiques ou psychiatriques.

Dans ce contexte de recherche méthodologique, mon objectif vise à **développer et utiliser de nouveaux radiopharmaceutiques TEP** pour :

- **Comprendre les mécanismes physiopathologiques**

Ces biomarqueurs cérébraux permettent de visualiser et de quantifier des cibles inexplorées et ainsi de comprendre les liens entre la neuro- et la gliotransmission et la physiopathologie

- **Proposer et valider des stratégies pour faciliter les diagnostics différentiels et précoces**

La mise en évidence de molécules spécifiquement associées au processus pathologique est nécessaire chez des patients dont le tableau clinique est insuffisamment étayé. Ceci nécessite de transformer ces molécules pour en faire des « sondes » détectables *in vivo*.

- **Valider des cibles thérapeutiques sur des modèles animaux et/ou chez les patients**

Par exemple, des radiotraceurs des récepteurs centraux, des protéines (amyloïdes ou α -synucléine) ou de la neuroinflammation peuvent mettre en évidence l'altération de la neurotransmission dans les processus neurodégénératifs.

- **Proposer des outils pour le suivi d'efficacité de traitement chez le patient**

Le développement de biomarqueurs de réponse thérapeutique accompagne de plus en plus l'évaluation des nouveaux traitements en neurologie et en psychiatrie.

Notre approche est translationnelle : elle débute par la chimie des molécules candidates et se poursuit par leur radiomarquage et l'imagerie TEP dans des modèles précliniques jusqu'aux premières études TEP chez l'homme (étude de première administration) et chez les patients pour ensuite diffuser les méthodes.

Les travaux développés ci-dessous portent notamment **sur le développement de nouveaux radiotraceurs TEP** : un radiotraceur candidat ciblant l' α -synucléine et deux radiotraceurs de la transmission sérotoninergique, un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et un antagoniste des récepteurs 5-HT₆, pour des applications en neurologie et psychiatrie.

1.1. IMAGERIE TEP DE L' α -SYNUCLEINE

Plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson ou la démence fronto-temporale sont maintenant décrites comme des « protéinopathies » dont les mécanismes cellulaires et moléculaires communs comprennent l'accumulation de protéines sous forme de dépôts insolubles ou « plaques » dans le SNC. Les protéines pathologiques sont généralement sous forme d'agrégats fibrillaires insolubles contenant des protéines mal repliées avec formation de feuillets β . Ces protéinopathies affectent des réseaux spécifiques (propres à chaque trouble) dans les manifestations précliniques, prodromiques et précoces de la maladie.

La priorité 2014-2019 de l'équipe BIORAN était de proposer des biomarqueurs non invasifs pouvant détecter une caractéristique fondamentale de ces pathologies neurodégénératives. Nos choix stratégiques nous ont amené à concentrer nos efforts de recherche sur deux types spécifiques de protéines impliquées dans ces maladies, les **protéines agrégées** et les **récepteurs**, représentant les deux principaux axes de recherche de l'équipe.

Vers un traceur TEP de l' α -synucléine ?

En termes de biochimie cérébrale, l'**agrégation des protéines** est une caractéristique commune à de nombreux troubles neurodégénératifs, et la compréhension de l'interaction entre les protéines pathologiques/toxiques conduisant à la neurodégénérescence est un axe de recherche fondamental (Jellinger, 2011). Il existe un chevauchement considérable entre les « protéinopathies » comme les amyloïdopathies, les synucléinopathies et les tauopathies ou d'autres maladies présentant des anomalies de configuration des protéines. De plus, plusieurs de ces dépôts ont une propagation de proche en proche, par un mécanisme corruptif qui semble analogue à celui de la protéine prion. Cette découverte fondamentale a bouleversé notre vision des pathologies neurodégénératives les plus fréquentes (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) (Jucker et al., 2013 ; Brettschneider et al., 2015).

La capacité à suivre le développement de ces amas protéiques par imagerie, du vivant du patient, fournit un critère physiopathologique complétant les critères cliniques et cognitifs. Ce point est crucial pour améliorer le diagnostic en termes de sensibilité et de spécificité, et pour homogénéiser les populations de patients participant à des essais thérapeutiques.

La faisabilité de l'imagerie TEP des dépôts de protéines sous forme fibrillaire a d'abord été démontrée dans le cas de la maladie d'Alzheimer, caractérisée par des dépôts de peptide β -amyloïde ($A\beta$). Le [^{11}C]PIB a été le premier radiotracer spécifique des plaques amyloïdes développé. Plusieurs radiotraceurs marqués au fluor 18 ([^{18}F]florbetapir, AMYVID® ; [^{18}F]florbetaben, NEURACEQ® ; [^{18}F]flutémétamol, VIZAMYL®) se sont ensuite

imposés comme l'outil de choix pour mesurer *in vivo* la charge amyloïde cérébrale en TEP. Ce biomarqueur d'imagerie est devenu un élément central pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques anti-amyloïdes, comme l'a montré la récente approbation de mise sur le marché américain par la FDA (Food and Drug Administration) de l'aducanumab puis du lecanemab (de la Torre et al., 2021 ; van Dyck et al., 2023). Si les preuves d'un bénéfice clinique de l'aducanumab restent encore à apporter, un ralentissement significatif du déclin cognitif a été mis en évidence avec le lecanemab. Cette efficacité biologique (« élimination » des plaques amyloïdes) a pu être démontrée grâce à l'imagerie TEP amyloïde (Sévigny et al., 2016). En cas d'approbation par l'EMA (Agence Européenne des Médicaments), la TEP amyloïde se trouve potentiellement à un tournant historique, puisqu'elle a ouvert la voie au diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer et qu'elle pourrait maintenant avoir également des implications thérapeutiques.

L'autre lésion caractéristique de la maladie d'Alzheimer est le neurofilament de protéine tau hyperphosphorylée causant des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Plusieurs radiotraceurs candidats ont été proposés pour cette cible et sont actuellement évalués chez l'homme (Villemagne et al., 2015). Malgré des difficultés supplémentaires par rapport à l'imagerie des plaques amyloïdes (cible intracellulaire, densité moindre, existence d'isoformes), le premier radiotraceur (^{18}F]FDDNP, traceur pan-amyloïde non sélectif) a permis d'explorer *in vivo* la distribution des DNF dès les années 2000. Des radiotraceurs TEP tau de première génération ont ensuite été développés : notamment le ^{18}F]THK-523, le ^{18}F]THK5317, le ^{18}F]THK5351, le ^{18}F]AV-1451 également connu sous le nom de ^{18}F]flortaucipir et le ^{11}C]PBB3 (Fodero-Tavoletti et al., 2011 ; Maruyama et al., 2021 ; Cassinelli Petersen et al., 2022). En 2020, le ^{18}F]flortaucipir (TAUVID®) est devenu le premier radiotraceur TEP tau approuvé pour un usage clinique par la FDA. Si le ^{18}F]flortaucipir offre des avantages pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, il présente néanmoins des limites, notamment sa liaison hors cible dans des structures cliniques importantes et sa faible affinité pour les fibrilles tau dans les tauopathies non liées à la maladie d'Alzheimer. Un certain nombre de radiotraceurs de deuxième génération ont donc été étudiés, comme le ^{18}F]RO-948, le ^{18}F]MK6240, le ^{18}F]PI2620, le ^{18}F]JNJ311 et le ^{18}F]GTP1. Ils présentent de bien meilleures caractéristiques : signal non-spécifique diminué, et notamment absence de liaison significative « off-target » à la protéine β -amyloïde et aux monoamine-oxydases (dans le striatum, ou les plexus choroïdes), entraînant une quantification plus robuste (Rigney et al., 2021).

On peut donc estimer qu'il a fallu au moins une quinzaine d'années pour développer l'imagerie amyloïde (Klunk et al., 2008), et que l'imagerie Tau arrive à maturité après une vingtaine d'années de recherche (Rigney et al., 2021).

L'identification de l'**alpha-synucléine** (**α -syn ou Syn**) comme protéine cérébrale à l'origine de syndromes neurodégénératifs est l'une des découvertes les plus passionnantes de ces 15 dernières années dans le domaine des neurosciences (Bendor et al., 2013).

Les synucléinopathies désignent un ensemble de pathologies neurodégénératives caractérisées par des inclusions fibrillaires de protéine α -synucléine : i) la maladie de Parkinson, qui touche 1 % des individus de plus de 60 ans et évolue vers la démence dans 30 % des cas, ii) la démence à corps de Lewy, qui représente la seconde cause de démence après la maladie d'Alzheimer et iii) l'atrophie multisystématisée (MSA). Il est fondamental de préciser que les pathologies concomitantes (*mixed dementia*) sont probablement la règle puisqu'on estime que la moitié des patients atteints de maladie d'Alzheimer présente une co-pathologie α -syn, et que la moitié des patients parkinsoniens présente une co-pathologie amyloïde (Alafuzoff et al., 2020 ; Trojanowski et al., 2002 ; Visanji et al., 2019).

Actuellement, les biomarqueurs d' α -syn existants sont uniquement périphériques (dosages dans le liquide céphalo-rachidien) ou *post mortem* (immunohistopathologie du SNC).

Il y a donc **un besoin évident de développement d'un premier radiotracteur TEP interagissant directement avec l' α -syn agrégée.**

La recherche d'un radiotracteur α -syn a réellement débuté qu'au début des années 2010. Nous avons fait partie des toutes premières équipes à se lancer dans le développement d'un **premier radiotracteur TEP ciblant l' α -syn** comme nouveau biomarqueur. Notre projet visait à proposer une « preuve de concept » pour un radiotracteur TEP de l' α -syn *in vitro* et *in vivo* en préclinique en vue de son passage dans des études d'imagerie chez les patients. Cela a justifié notre stratégie de développement qui comportait les étapes suivantes :

1) Synthèse et radiomarquage de molécules candidates (radiotraceurs)

Contrairement aux premiers traceurs amyloïdes qui étaient des dérivés de colorants connus en histologie (rouge congo, thioflavine), aucune molécule spécifique n'existe pour l' α -syn. Seules certaines colorations à l'argent (Campbell-Switzer/Gallyas), peu utilisées, sont réputées marquer sélectivement les agrégats cérébraux d' α -syn.

Nous avons fait le choix de nous orienter vers les composés benzoxazoles et notamment le **BF227**, initialement prometteur dans l'imagerie amyloïde (Kudo et al., 2007) et qui semblait se fixer à l' α -syn. En effet, l'équipe de Fodero-Tavoletti et al. (2009) avait montré que le BF227 marqué du fluor 18 se fixait aux fibrilles α -syn synthétiques dans une étude *in vitro* de liaison sur filtre (mais pas sur homogénats de cerveaux humains). Une étude TEP chez des patients atteints de MSA avait également rapporté l'intérêt du [¹¹C]BF227 pour l'imagerie α -syn (Kikuchi et al., 2010). Ainsi, la synthèse du [¹⁸F]BF227 a été importée et développée dans l'équipe (Figure 1).

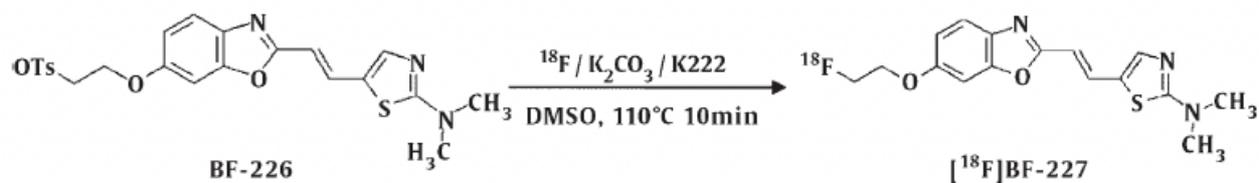


Figure 1 : Synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{BF227}$ (Fodero-Tavoletti et al., 2009)

Pour le développement d'un nouveau radiopharmaceutique TEP fluoré ciblant l' α -syn, **une dizaine de précurseurs candidats** non radioactifs ont été conçus à partir de trois familles chimiques (Dr Thierry Billard, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires de Lyon, ICBMS, Université Lyon1/CNRS/CPE-Lyon/INSA Lyon) (Figure 2).

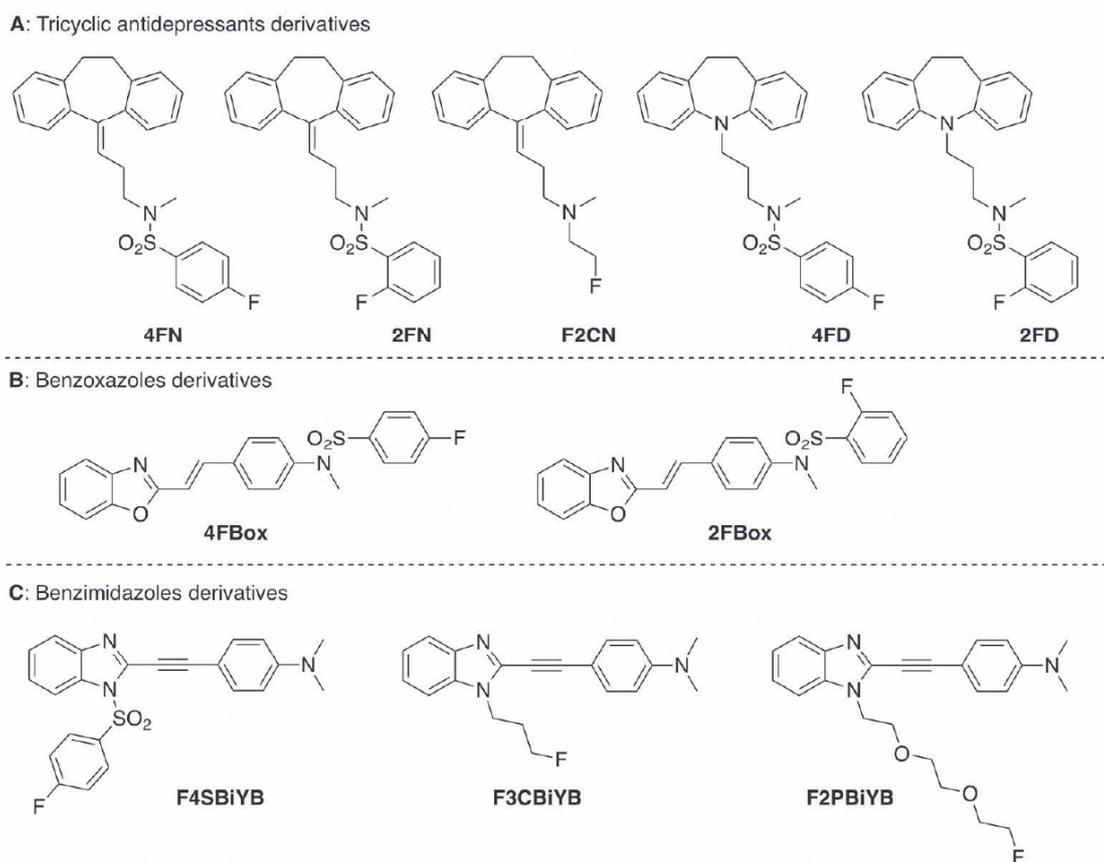


Figure 2 : Candidats traceurs synthétisés à partir de trois familles, dérivés des A) antidépresseurs tricycliques B) benzoxazoles C) benzimidazoles (Verdurand et al., 2018a)

En collaboration avec le Pr Raphaël Terreux (Laboratoire de Biologie tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR5305, Lyon1), des outils de modélisation bioinformatique ont permis de modéliser une fibrille d' α -syn et d'identifier des sites de liaison ainsi que leur accessibilité. Cette étape a permis de sélectionner les meilleurs candidats qui ont été radiomarqués au fluor 18.

2) Evaluation des radiotraceurs candidats

Dès le début du projet, nous avons identifié des difficultés dans notre démarche d'évaluation. D'une part, la structure exacte des agrégats humains étant mal connue, la validation d'un modèle animal restait difficile. D'autre part, la faible densité des corps de Lewy (agrégats anormaux d' α -syn) dans les zones corticales (en comparaison aux plaques amyloïdes mais aussi aux DNF) laissait présager que le processus de sélection à partir des seuls tissus humains était risqué.

Afin d'évaluer nos candidats radiotraceurs, nous avons par conséquent opté pour une stratégie mixte visant à réaliser différentes études d'imagerie *in vitro*, *in vivo* et, finalement, *post mortem*, avec notamment :

- **La réalisation d'études *in vivo* chez un modèle de souris transgénique** (Mougenot et al., 2012)
 Cette souche de souris transgénique TgM83 sur-exprimant la protéine α -syn humaine sous forme mutée (impliquée dans une forme familiale de la maladie de Parkinson) était accessible via une collaboration avec une équipe de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) à Lyon (Dr Thierry Baron) ;
- **Le développement d'un modèle original de perfusion intracérébrale d' α -syn humaine chez le rat** (injection stéréotaxique de fibrilles α -syn vs $A\beta$, α -syn agrégée vs non-agrégée...). La perfusion de peptide β -amyloïde pré-agrégé fournit ainsi un contrôle négatif précieux pour évaluer la spécificité des radioligands envers d'autres structures en feuillets β . Ce modèle original est simple à mettre en œuvre, efficace pour caractériser nos agrégats fibrillaires et adapté au criblage des molécules pour évaluer la sélectivité des radiotraceurs (injection intracérébrale ipsi vs contralatéral) ;
- **La réalisation d'études *in vitro* sur tissus humains** possédant une densité importante de cible
 Nous avons obtenu des coupes et blocs congelés de medulla de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de démence à corps de Lewy ou de MSA, issus de la cérébrothèque de Londres (MRC London Neurodegenerative

Diseases Brain Bank) et du Centre de Ressources Biologiques en santé humaine des Hôpitaux de Lyon (Cardiobiotec, CRB-HCL). Cette région cérébrale a également l'avantage de ne pas présenter de co-pathologie β -amyloïde.

Evaluation du [¹⁸F]BF227

Dans un premier temps, le [¹⁸F]BF227 a été testé *in vivo* chez la souche de souris TgM83 pour vérifier l'affinité supposée du traceur pour l' α -syn humaine. Malheureusement, ce traceur n'a pas pu mettre en évidence les inclusions d' α -syn.

Annexe 1 : sélection d'article n°1 (page 83)

Levigoureux E, et al. Binding of the PET radiotracer [¹⁸F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(10):955-60. doi: 10.2174/1567205011666141107154201.

Le [¹⁸F]BF227 a également été évalué sur les tissus de patients atteints de MSA (Verdurand et al., 2018b). L'étude autoradiographique n'a révélé aucun signal spécifique chez les patients atteints de MSA par rapport aux témoins, malgré la présence de pathologie généralisée confirmée par immunofluorescence. Notre expérience n'a donc pas confirmé les observations de Kikuchi et al. (2010) : le [¹⁸F]BF227 ne se fixe pas de manière spécifique aux inclusions d' α -syn humaines.

Evaluation des autres traceurs candidats

Nos 10 traceurs candidats ont été explorés avant radiomarquage extemporané au fluor 18 par des approches *in vitro* :

- D'autoradiographies sur coupes de rongeurs et humaines corrélées à l'immunohistochimie (comme pour l'évaluation du [¹⁸F]BF227),
- Des études pharmacologiques de liaison sur filtres (compétition) sur des homogénats de rongeurs et humains.

Ces techniques ont dû être développées et validées en amont au laboratoire (Verdurand et al., 2018a ; Verdurand et al., 2018b). La méthode de liaison sur filtre (sur plaque 96 puits) a été difficilement validée en raison de la forte rétention non spécifique qui perturbe la détermination des affinités (Motulsky and Neubig, 2001).

Les deux meilleurs candidats, le [¹⁸F]2FBox et le [¹⁸F]4FBox (dérivés benzoxazoles) ont ensuite été radiomarqués au fluor 18 et testés.

Si les études pharmacologiques de saturation et les études d'imagerie *ex vivo* chez des rongeurs auxquels des fibrilles synthétiques d'A β ou d' α -syn avaient été injectées ont montré des résultats encourageants, les expériences d'autoradiographie dans le tissu cérébral *post mortem* et les études microTEP/CT chez le modèle TgM83 avec ces deux candidats radiotraceurs n'ont pas permis de détecter les agrégats d' α -syn.

En conclusion, les molécules candidates dérivées du noyau benzoxazole que nous avons synthétisées, radiomarquées et évaluées se liaient aux fibrilles de synthèse mais pas au tissu humain pathologique. Une autre équipe a travaillé sur le même noyau benzoxazole

(Josephson et al., 2018), sans parvenir à une affinité et sélectivité suffisante pour une application *in vivo*.

Effets des peptides agrégés sur la neurotransmission

Devant l'échec de l'identification d'un radiotracer de l' α -syn, le projet a été réorienté vers l'étude de la relation entre le développement des agrégats d' α -syn dans le modèle TgM83 et les conséquences sur les systèmes de neurotransmission monoaminergique (en particulier sérotoninergique et dopaminergique) (Long-Smith, 2009). La potentielle implication de l' α -syn dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique et dans la pathophysiologie de la maladie de Parkinson est largement décrite (Butler et al., 2017 ; Factor et al., 2017). Les systèmes non dopaminergiques sont également touchés, y compris les neurones sérotoninergiques. Il est donc probable que l' α -syn impacte le fonctionnement des systèmes sérotoninergiques et contribue aux autres symptômes, tels que les troubles cognitifs et les troubles émotionnels (Wan et al., 2016).

Annexe 2 : sélection d'article n°2 (page 90)

Levigoureux E, et al. PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Jan;25(1):57-68. doi: 10.1111/cns.12978.

L'étude de Levigoureux et al. (2019) met en évidence l'influence de l' α -syn sur les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques : l' α -syn physiologique module l'expression du récepteur D2, alors que seule l' α -syn pathologique module l'expression du récepteur 5-HT₁. Nos résultats soulignent l'intérêt de la neuro-imagerie TEP *in vivo* avec les mêmes radiotraceurs pour l'exploration de la réactivité de la neurotransmission dans les modèles de synucléinopathie et les stades précoces de pathologies neurodégénératives.

Arrêt du projet α -syn

Malgré nos approches multidisciplinaires et translationnelles, construites au prix de plusieurs années de travail de développement technologique, nous n'avons pas été en mesure de proposer des radiotraceurs-candidats pour l'imagerie TEP de l' α -syn. Au-delà des défis radiopharmacologiques propres au développement d'un ligand pour les protéines agrégées, ces échecs sont notamment liés à la faible densité et à la méconnaissance de la structure de la cible. Le criblage de molécules sur fibrilles α -syn pré-formées *in vitro* semble une voie sans issue, même supporté par un effort de design rationnel, car la sélectivité obtenue sur fibrilles n'est jamais retrouvée sur le tissu de patient (Lengyel-Zhand et al., 2020). La composition plus complexe qu'attendue des corps de Lewy (Shahmoradian et al., 2019) explique probablement les échecs répétés avec ces approches classiques.

Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'arrêter ce projet. Malgré l'échec, ce projet a été fédérateur pour l'équipe BIORAN et a tout de même conduit à la publication de 4 articles dans des revues internationales (Levigoureux et al., 2014 ; Verdurand et al, 2018a ; Verdurand et al. 2018b ; Levigoureux et al., 2019) et, surtout, la mise en place de

techniques que nous utiliserons pour d'autres projets futurs (voies de synthèse chimique, études de liaison sur filtre...).

Quelques années plus tard, les perspectives de diagnostic de synucléinopathies à un stade ultra-précoce, notamment grâce à un radiotracer spécifique de l' α -syn, sont toujours aussi prometteuses et d'actualité (Vernon et al., 2010 ; Eberling et al., 2013). Ainsi, la Fondation MJ Fox a donné la priorité à la recherche d'un traceur PET α -syn, en organisant un consortium américain pour développer un tel outil. En 2016, la Fondation a annoncé un prix de 2 millions de dollars pour le premier groupe qui présentera des données humaines sur un traceur α -syn viable et sélectif.

Malgré les incitations financières, il n'existe toujours pas de radiotracer spécifique de l' α -syn. Toutes les équipes ayant travaillé sur le sujet ont connu des difficultés similaires. En effet, tous les criblages et évaluations *in vivo* publiés à ce jour ont abouti à des radioligands encore trop peu sélectifs, incapables de différencier les agrégats α -syn, $A\beta$ ou Tau, ou bien présentant une affinité trop faible et/ou une liaison non spécifique trop forte (Bagchi et al., 2013 ; Neal et al., 2013 ; Zhang et al., 2014 ; Chu et al., 2015 ; Maurer et al., 2020 ; Kuebler et al., 2020 ; Kaide et al., 2020 ; Ferrie et al., 2020). Plusieurs revues exhaustives montrent l'ampleur de l'effort qui a été produit à ce jour, avec une vingtaine de squelettes chimiques explorés (Korat et al., 2021 ; Kallinen and Kassiou, 2022 ; Prange et al., 2022 ; Wang et al., 2023).

1.2. VERS LE PREMIER RADIOTRACEUR TEP DES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES 5-HT₆

Les récepteurs 5-HT₆, une nouvelle cible dans la maladie d'Alzheimer ?

Les récepteurs 5-HT₆ font partie de la famille des récepteurs à la sérotonine les plus récemment identifiés. Ils sont fréquemment rapportés comme étant impliqués dans des processus physiopathologiques et comme éventuelle cible thérapeutique. Plusieurs laboratoires pharmaceutiques ont d'ailleurs développé de nouveaux médicaments visant spécifiquement ce récepteur : en tant qu'antipsychotiques dans la schizophrénie, inhibiteurs de l'appétit dans l'obésité et, des médicaments procognitifs dans la maladie d'Alzheimer et les démences associées (Gravius et al., 2011 ; Grychowska et al., 2016 ; Wicke et al., 2015).

Le sous-type du récepteur 5-HT₆ est une cible sérotoninergique particulièrement intéressante, puisqu'il est pratiquement exclusivement exprimé dans le système nerveux central, dans les régions cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la cognition et la mémoire (Meneses, 2014 ; Ferrero et al. 2017). Ce récepteur a été proposé dans la prise en charge symptomatique de la MA et maladies apparentées (Ramirez et al., 2014), puisqu'il

a été retrouvé à des taux inférieurs dans le cerveau de patients atteints de la MA dans une étude *post mortem* (Dayer et al., 2015). De plus, le blocage du récepteur 5-HT₆ induisant la libération d'acétylcholine, un taux de récepteurs 5-HT₆ réduit pourrait être une stratégie pour restaurer les niveaux d'acétylcholine dans un système cholinergique déficient (Lorke et al., 2006). Aussi, la dysrégulation de l'activation des récepteurs 5-HT₆ par la sérotonine dans le cortex temporal semble être liée à des symptômes comportementaux dans la MA (Codony et al., 2011). De plus, des études précliniques ont montré l'intérêt thérapeutique potentiel de ligands des récepteurs 5-HT₆. Par exemple, Karila et al. (2015) ont mis en évidence qu'à l'instar des antagonistes, les agonistes des récepteurs 5-HT₆ peuvent paradoxalement avoir des effets procognitifs. La recherche de composés agonistes partiels ou inverses comme stimulants cognitifs potentiels pourraient également être plus prometteurs dans des essais clinique sur la MA (Vanda et al., 2018).

L'exploration de cette nouvelle cible est par conséquent indispensable pour étudier le rôle des récepteurs 5-HT₆ dans la MA en l'absence de traitement efficace et potentiellement pour l'évaluation de futures molécules candidates en thérapie (Khoury et al., 2018; Nirogi et al., 2019). Cependant, la compréhension de la pharmacologie des récepteurs 5-HT₆ est actuellement partielle et son exploration est limitée aux modèles animaux.

Dans ce contexte de recherche neuropharmacologique, l'imagerie TEP tient une place importante pour élucider *in vivo* les mécanismes physiopathologiques et neuropharmacologiques liés à la cible pharmacologique, en particulier dans la maladie d'Alzheimer (Declercq et al., 2016 ; Lancelot and Zimmer, 2010). Il existe donc un réel intérêt à **développer un radiopharmaceutique TEP spécifique des récepteurs 5-HT₆**. Ce type de radiopharmaceutique permettrait d'élucider d'une part l'implication de ces récepteurs dans les maladies neurodégénératives et d'autre part les effets de nouvelles molécules (agonistes ou antagonistes) ciblant les récepteurs 5-HT₆.

Les premières tentatives de développement de radioligand n'ont pas permis de distinguer formellement le sous-type 6 des récepteurs à la sérotonine. Parmi les radiotraceurs développés, le [¹⁸F]12ST05 s'est montré non spécifique des récepteurs 5HT₆ (Tang et al., 2007). Le [¹¹C]399885 possède une mauvaise pénétration cérébrale qui le rend incompatible avec une injection par voie périphérique (Liu et al., 2011). Le [¹¹C]GSK215083 a été le premier radiotraceur TEP des récepteurs 5-HT₆ administré chez l'homme mais ce dernier n'est pas sélectif avec une affinité non négligeable envers le récepteur 5-HT_{2A} (K_i = 0,79 nM) ce qui complique l'interprétation de l'image TEP (Chopra, 2004 ; Parker et al., 2012).

Dans ce contexte, nous avons été parmi les premiers à **développer des radioligands fluorés 5-HT₆** et, par le biais d'une approche translationnelle, à les évaluer en imagerie TEP. Le marquage au fluor 18 présente l'avantage d'avoir une période physique (T = 110 min) compatible avec une utilisation en routine clinique.

Toujours en collaboration avec des chercheurs de l'ICBMS (Dr Thierry Billard), divers ligands à base de quinoléine et de pyridine ont été synthétisés, sur la base du pharmacophore connu du récepteur 5-HT₆. Seuls les ligands présentant les affinités *in vitro* les plus élevées envers les récepteurs 5-HT₆ et les affinités les plus faibles envers les récepteurs 5-HT_{2A} (un pharmacophore proche) ont été radiomarqués au fluor 18 par substitution nucléophile aromatique. Sur huit molécules synthétisées, une, le [¹⁸F]2FNQ1P a montré de bonnes caractéristiques pour un candidat radiopharmaceutique (Figure 3).

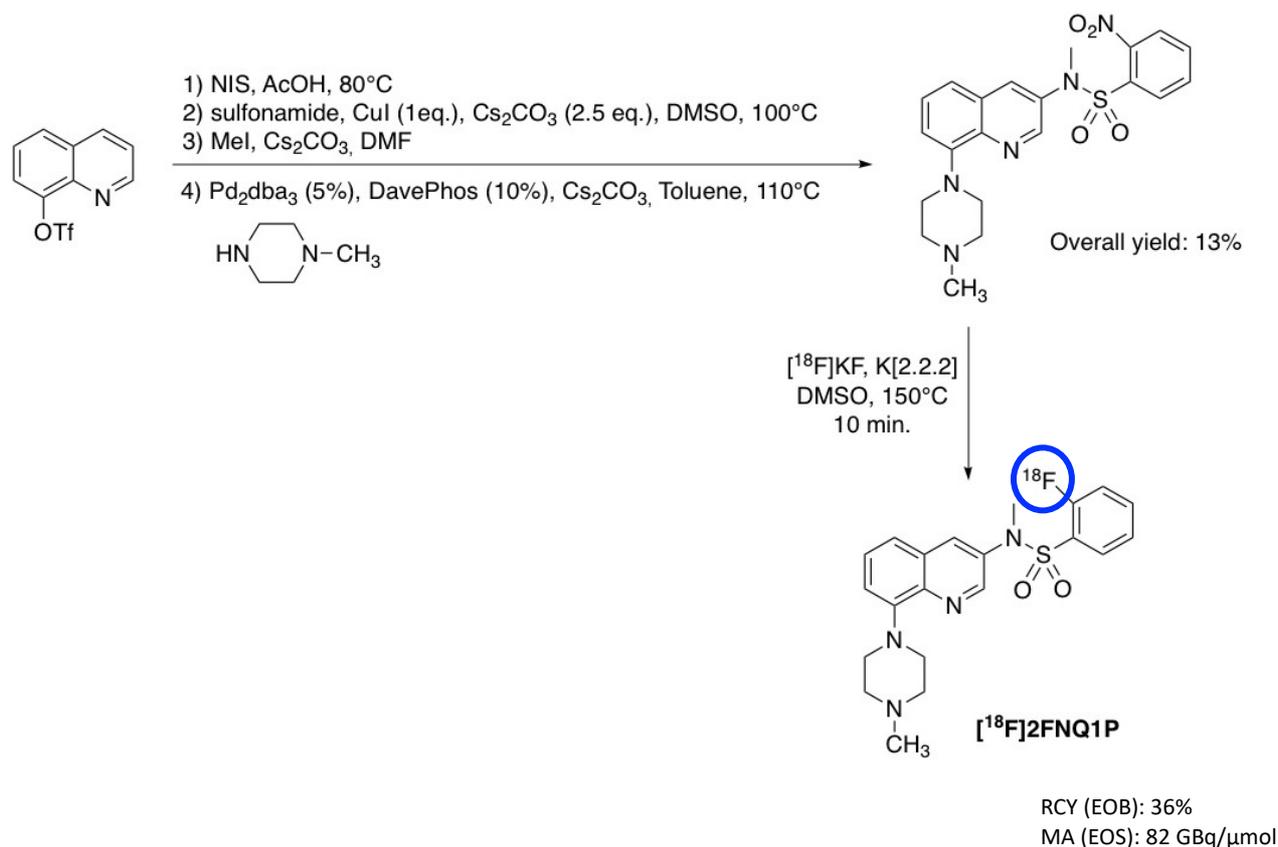


Figure 3 : Voie de synthèse du [¹⁸F]2FNQ1P.

Les premières études d'imagerie chez le rongeur ont cependant été décevantes puisque le radiotracer ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Nous avons proposé que la P-gp (surexprimée chez le rat) interagisse avec le [¹⁸F]2FNQ1P et régule fortement sa pénétration dans le cerveau.

Des études complémentaires chez le chat anesthésié et le primate non-humain (PNH) ont cependant démontré que le [¹⁸F]2FNQ1P présente de bons résultats en termes de passage de la BHE, de spécificité et de sélectivité pour les récepteurs 5-HT₆ vis-à-vis d'autres cibles de récepteurs (Becker et al., 2015 ; Colomb et al., 2014) (Figure 4). De plus, la fixation du [¹⁸F]2FNQ1P est en accord avec la distribution connue des récepteurs 5-HT₆ dans le cerveau.

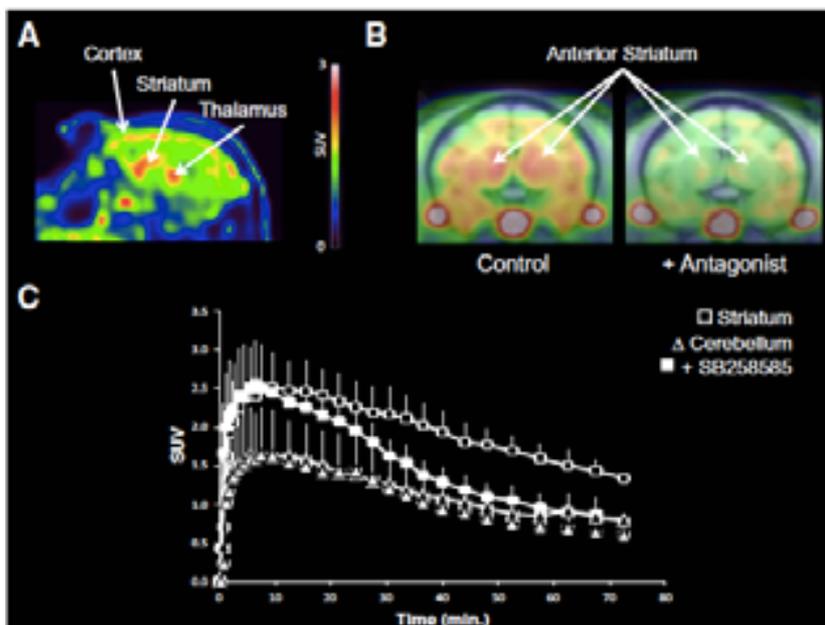


Figure 4 : Images TEP au $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ chez le primate non-humain

A) Images sommes (0-75 min), vue sagittale ; B) Images sommes (50-75 min), vue coronale (fusionnée avec l'IRM) montrant un déplacement avec le SB258585, antagoniste des récepteur 5-HT₆ ; C) Courbe activité fonction du temps à la baseline (cercles blancs), et après injection de 1,5 mg/kg de SB258585 10 min avant l'administration du radiotracer (ronds blancs).

Echelle colorimétrique de la fixation la plus faible (bleu) à la plus élevée (rouge)
(Becker et al., 2015)

Ainsi, une forte fixation du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ est retrouvée dans les régions riches en récepteurs 5-HT₆ (ganglions de la base et régions limbiques).

Une autre étude chez le PNH a permis de valider la reproductibilité et la précision de la liaison du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ (Sgambato-Faure et al., 2017). Ce travail de fiabilité test-retest de la liaison du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ est un argument en faveur de son utilisation dans de futures indications cliniques, d'autant plus que le récepteur 5-HT₆ présente un degré d'homologie inter-espèce élevé entre le PNH et l'homme.

L'ensemble des résultats obtenus avec ce premier radiotracer TEP fluoré pour l'imagerie des récepteurs 5-HT₆ a donc justifié la poursuite du développement avec pour objectif un **transfert du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ vers une étude de première administration chez l'homme.**

Dans ce contexte, un financement de la Fondation Plan Alzheimer 2016 (146 k€) nous a permis 1/ de réaliser des études précliniques et radiopharmacologiques complémentaires et 2/ d'obtenir des lots cliniques de précurseurs, l'ensemble de ces éléments étant

indispensables à l'élaboration du Dossier du Médicament Experimental (DME) pour une étude de première administration chez l'homme.

Etudes précliniques et radiopharmacologiques complémentaires

Afin d'obtenir des données précliniques complémentaires, nous avons réalisé des études de caractérisation radiopharmacologique du [^{18}F]2FNQ1P *in vitro* et *in vivo* chez le rat, le porc, le PNH et des tissus humains (sujets sains) (Emery et al., 2020).

Dans cette optique, nous avons réalisé des études autoradiographiques et de saturation sur tissus de cerveau *post mortem*. Pour toutes les espèces, les autoradiographies ont révélé une forte fixation du [^{18}F]2FNQ1P dans les régions cérébrales dont la densité est riche en récepteurs 5-HT₆. Cette fixation a par ailleurs été à nouveau bloquée par l'addition de SB258585 (molécule antagoniste des récepteurs 5-HT₆) confirmant la bonne spécificité du traceur (Figure 5).

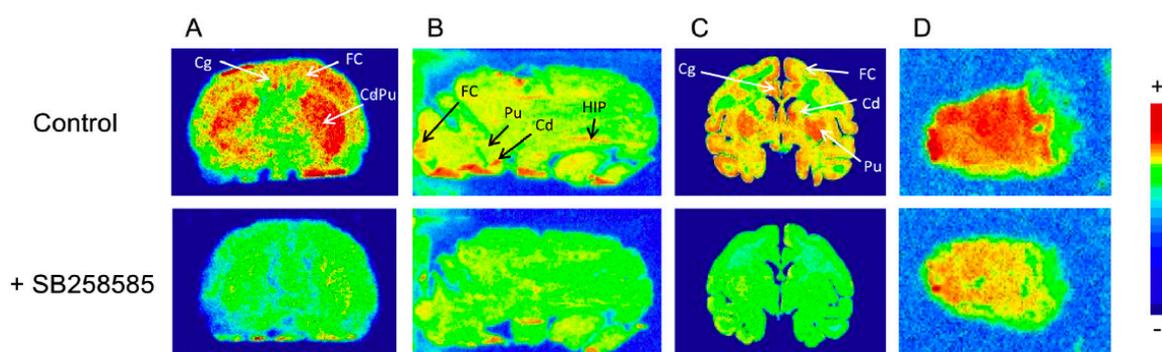


Figure 5 : Autoradiogrammes représentatifs de la fixation du [^{18}F]2FNQ1P chez le rat (A), le porc (B), le primate non-humain (C) et le noyau caudé humain (D) (coupes sagittales pour les cerveaux de porc et coupes coronales pour les cerveaux de rat et primate non-humain).

La distribution du [^{18}F]2FNQ1P dans les régions cérébrales a été réalisée en condition basale (fixation totale) et en présence de SB258585 (fixation non spécifique). Les flèches montrent le cortex frontal (FC), le cortex cingulaire (Cg), le noyau caudé (Cd), le putamen (Pu) et l'hippocampe (HIP) (Emery et al., 2020).

Les études de saturation *in vitro* ont donné des valeurs de K_D et B_{\max} de 1,34 nM et 0,03 pmol.mg⁻¹ chez le rat, 0,60 nM et 0,04 pmol.mg⁻¹ chez le porc, 1,38 nM et 0,07 pmol.mg⁻¹ chez le PNH et 1,39 nM et 0,15 pmol.mg⁻¹ pour le noyau caudé humain (Figure 6).

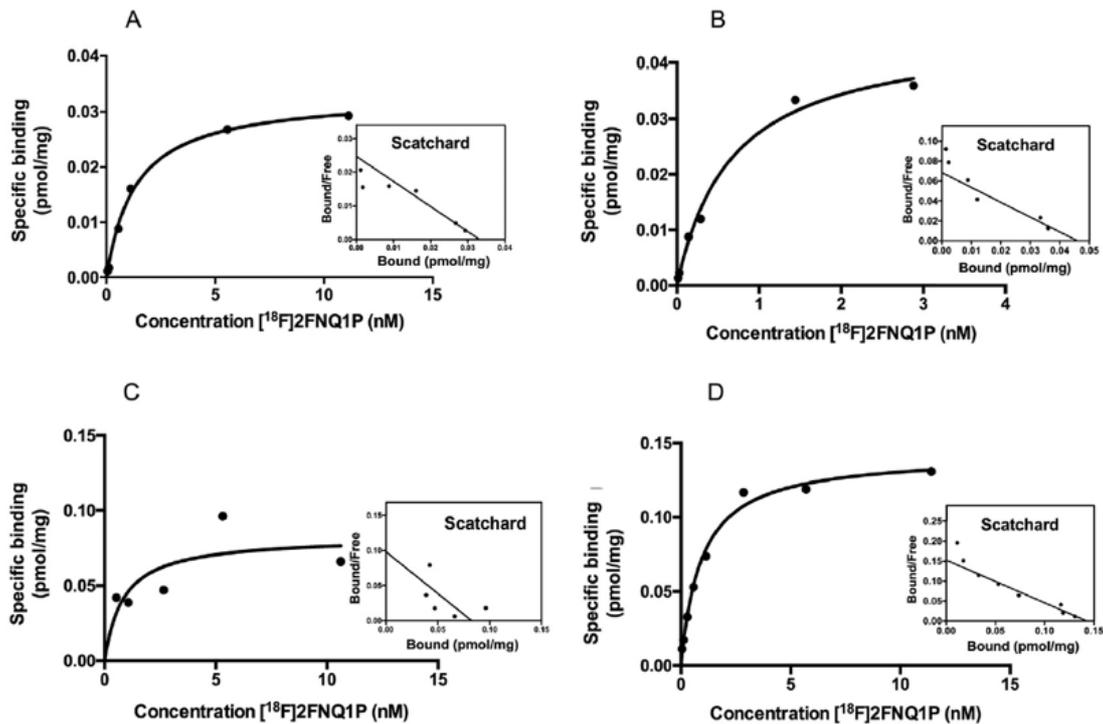


Figure 6 : Etude de binding *in vitro* chez le rat (A), le porc (B), le primate non-humain (C) et le noyau caudé humain (D).

Exemple de courbe de saturation et de droite de Scatchard pour le $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ (Emery et al., 2020).

L'étude de stabilité sur sérum de rat, porc, PNH et humain a montré une bonne stabilité du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ sur une période de deux heures.

En parallèle, des études de radiométabolites et de biodistribution chez le rat ont été réalisées. Au niveau cérébral, la proportion de $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ non métabolisé était supérieure à 99 % 5 min après l'administration intraveineuse et de 89 % à 40 min.

Les études de biodistribution ont montré un maximum de radioactivité dans les poumons ($3,5 \pm 1,2$ % ID/g) et les reins ($2,0 \pm 0,7$ % ID/g) 15 min après injection.

L'ensemble de ces résultats confirme la bonne spécificité et les bonnes caractéristiques radiopharmacologiques du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ pour un passage à l'homme.

Nous avons également mené une étude autoradiographique sur des **tissus humains de patients atteints de la maladie d'Alzheimer** (noyau caudé) issus de la cérébrothèque de Londres (MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank) et du Centre de Ressources Biologiques en santé humaine des Hôpitaux de Lyon (Cardiobiotec, CRB-HCL). Au fur et à mesure de l'avancée du stade de maladie, une diminution de la fixation du [¹⁸F]2FNQ1P est mise en évidence chez les patients atteints de MA par rapport au groupe contrôle.

Annexe 3 : sélection d'article n°3 (page 103)

Courault P, et al. Change in Expression of 5-HT₆ Receptor at Different Stages of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study with the PET Radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P. J Alzheimers Dis. 2020;75(4):1329-1338.

Obtention de lots cliniques de précurseurs

Après synthèse de 800 mg de précurseur du 2FNQ1P, nous avons sous-traité la production de lots cliniques de précurseur (ERAS Labo, Grenoble). Malheureusement, la présence de quantités de palladium (qui intervient dans la synthèse, Figure 3) supérieures aux limites admises dans la Pharmacopée européenne a interrompu le projet pendant de nombreux mois. Après plusieurs étapes de purification, **nous avons finalement pu obtenir un lot de précurseur de qualité pharmaceutique**. Nous n'avons **malheureusement pas encore débuté les études de toxicologie réglementaires**. Ces études étant particulièrement onéreuses (~ 130 k€), il nous faut dorénavant trouver un complément de financement pour la poursuite de ce projet.

Poursuite du projet dans la MA ?

En thérapie, il était attendu que les molécules candidates antagonistes des récepteurs 5-HT₆ aient un profil d'efficacité différent, voire un effet de potentialisation vis-à-vis des molécules existantes (inhibiteurs de la cholinestérase et antagoniste du NMDA) sur les symptômes de la maladie (Benhamú et al., 2014 ; Claeysen et al., 2015). Certains antagonistes des récepteurs 5-HT₆ ont fait l'objet de plusieurs études de phase II et III en thérapie dans les maladies neurodégénératives en tant que « boosters » de la neurotransmission cholinergique et/ou stimulant procognitif (Wilkinson et al., 2014). Cependant, tous les essais cliniques ayant ciblé les récepteurs 5-HT₆ dans la maladie d'Alzheimer ont échoué en phase III (Frölich et al., 2019 ; Matsunaga et al., 2018 ; Nirogi et al., 2018).

Comme pour les autres cibles potentielles dans la MA (i.e. agrégats de protéine amyloïde), les essais cliniques évaluant de nouvelles molécules en thérapie et visant à stopper l'évolution de la MA sont réalisés dans des conditions difficiles, avec de nombreuses limites (notamment l'absence de biomarqueurs permettant le diagnostic de certitude de MA pour

les inclusions et l'élaboration des groupes de patients dans les études cliniques) (Atri et al., 2018). Dans ces conditions, il est difficile de démontrer un impact efficace de ces nouvelles thérapeutiques sur la progression de la maladie. Ces résultats sont également liés au manque de connaissance sur la pharmacologie des récepteurs 5-HT₆ chez l'homme. Bien qu'il semble que ce récepteur soit impliqué dans la progression de la maladie, la fonctionnalité des récepteurs 5-HT₆ apparaît beaucoup plus complexe que ce que l'on pensait initialement. Ainsi, l'apport de l'imagerie TEP pour une cible thérapeutique ciblant les récepteurs 5-HT₆ suscite dorénavant moins d'intérêt dans les maladies neurodégénératives. Pour autant, le **développement d'un nouveau radiopharmaceutique spécifique des récepteurs 5-HT₆ reste un de nos objectifs.**

1.3. DEVELOPPEMENT D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE AGONISTE DES RECEPTEURS 5-HT_{1A}

Intérêt de la neuroimagerie des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels

Le développement de ligands TEP permet l'exploration *in vivo* des récepteurs du cerveau humain, y compris les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} connus pour être impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques.

L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} a permis d'apporter une meilleure compréhension du rôle fonctionnel de ces récepteurs, ainsi que de leur potentiel en tant que cible thérapeutique mais aussi en tant que biomarqueur du système sérotoninergique.

Il a été démontré *in vitro* que le récepteur 5-HT_{1A}, récepteur couplé aux protéines G (RCPG), peut exister dans différents états : un état de haute affinité lorsqu'il est couplé aux protéines G et un état de faible affinité, non couplé (Mongeau et al., 1992). Cette propriété implique que les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} se fixent préférentiellement aux récepteurs de haute affinité, couplés aux protéines G à l'état « fonctionnel » (Watson et al., 2000). En revanche, les antagonistes se fixent indifféremment aux récepteurs couplés ou non et permettent donc de mesurer la part totale des récepteurs qu'ils soient fonctionnels ou non (Gozlan et al., 1995) (Figure 7).

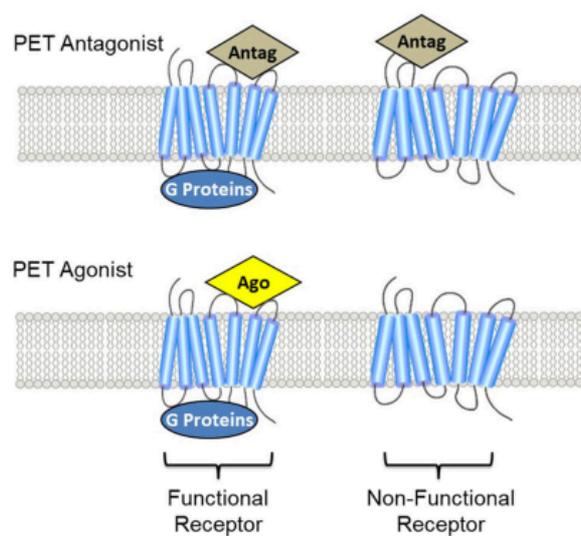


Figure 7 : Concept de sélectivité fonctionnelle des RCPG en pharmacologie

De nombreuses études suggèrent que cet état de couplage pourrait être impliqué dans les mécanismes physiopathologiques (Aznavor and Zimmer, 2007). Dans ce contexte, la comparaison de la liaison d'un antagoniste, marquant indifféremment les différents états des récepteurs, avec celle d'un agoniste, marquant préférentiellement les récepteurs couplés aux protéines G, pourrait refléter la proportion de récepteurs fonctionnels. Ainsi, deux radiotraceurs ciblant le même récepteur, l'un agoniste et l'autre antagoniste, pourraient avoir des profils de fixation différents selon l'état de couplage des récepteurs.

L'imagerie TEP avec un radiopharmaceutique agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (*i.e.* qui se fixe uniquement aux récepteurs fonctionnels) présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la fixation de ce traceur pourrait refléter la part de récepteurs directement mobilisables pour le neurotransmetteur endogène (Newman-Tancredi et al., 2022). Lors de la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique au cours d'un phénomène physiopathologique ou pharmacologique, le neurotransmetteur serait directement en compétition avec le radiotraceur et pourrait entraîner une diminution du signal enregistré lors de l'acquisition TEP. L'imagerie de cette fluctuation endogène de neurotransmetteur serait donc un **biomarqueur indirect de la neurotransmission**. Cette sensibilité au neurotransmetteur endogène n'est pas mise en évidence avec les radiotraceurs antagonistes qui se fixent également aux récepteurs non fonctionnels.

Un autre argument en faveur du développement de radiotraceurs agonistes est que la **quantification des récepteurs couplés** dans certaines pathologies pourrait être un **biomarqueur plus précoce** que la perte d'expression du récepteur lui-même.

D'autre part, les RCPG sont des récepteurs complexes qui entraînent de multiples changements intracellulaires essentiels au maintien de l'homéostasie cérébrale (Hauser et al., 2017 ; Jastrzebska et al., 2011). La **détermination de leur taux de couplage/découplage** à l'aide d'un couple de radiotraceurs agoniste/antagoniste, pourrait être utile dans la **compréhension des mécanismes physiopathologiques ou de l'efficacité de certains traitements** (Albizu et al., 2010 ; Björk et al., 2011).

Enfin, un radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} pourrait être un outil intéressant dans le cadre du **concept pharmacologique récent d'agoniste biaisé**, selon lequel différentes voies intracellulaires peuvent être activées en fonction de l'affinité des molécules pour leurs récepteurs et de leur couplage (Newman-Tancredi et al., 2022).

Des études précliniques en TEP avec différents agonistes biaisés du récepteur 5-HT_{1A} ont montré des profils de fixation différents en lien avec les mécanismes d'action pharmacologiques décrits pour les molécules (Lemoine et al., 2012 ; Yokoyama et al., 2016). Ainsi, l'utilisation d'agonistes biaisés TEP pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes d'action de médicaments.

Les radiopharmaceutiques TEP antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A}

Actuellement, la quasi-totalité des radiotraceurs utilisés en neuroimagerie, y compris ceux ciblant les récepteurs 5-HT_{1A}, sont des antagonistes (Colom et al., 2019). Ceci est lié au fait que les antagonistes présentent une meilleure sélectivité vis-à-vis de leur cible et qu'un plus grand nombre de molécules est disponible par rapport aux agonistes.

Le premier radiopharmaceutique TEP antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} utilisé chez l'Homme a été le [¹¹C]WAY100635 (Forster et al., 1995). Ce dérivé de la pipérazine présente une haute affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} ($K_D \sim 0,3$ nM) et une grande sélectivité. La synthèse de [O-méthyl-¹¹C]WAY100635 a donné lieu à la première image des récepteurs 5-HT_{1A} chez l'Homme mais présentait l'inconvénient de produire une grande quantité de métabolites cérébraux (Pike et al., 1995). Le [carbonyl-¹¹C]WAY100635 a donc été synthétisé (Hwang et al., 1999 ; McCarron et al., 1996). Ce dernier, dont les métabolites ne franchissent pas la BHE, a permis de réaliser la première cartographie des récepteurs 5-HT_{1A} chez l'Homme en 2002 (Rabiner et al., 2002), et fait l'objet d'études cliniques dans de nombreuses indications telles que la dépression, l'anxiété, la maladie de Parkinson, la schizophrénie, l'épilepsie ou la maladie d'Alzheimer (Hesselgrave et al., 2013 ; Sullivan et al., 2013 ; Ito et al., 2007 ; Tauscher et al., 2002 ; Lanctôt et al., 2007).

Le *p*-MPPF, un autre dérivé de la pipérazine avec une affinité élevée pour les récepteurs 5-HT_{1A} a été radiomarqué au fluor 18 (Zhuang et al., 1994). Le [¹⁸F]MPPF a permis d'explorer les récepteurs 5-HT_{1A} chez l'Homme (Shiue et al., 1997 ; Passchier et al., 2000). Après une étude de modélisation complète (Sanabria-Bohorquez et al., 2002 ; Costes et al., 2002), ce radiotracer a également été utilisé dans de nombreuses indications (Kepe et al., 2006 ; Lothe et al., 2012 ; Lothe et al., 2008 ; Lerond et al., 2013 ; Derry et al., 2006).

Le [¹¹C]WAY100635 et le [¹⁸F]MPPF ont des profils de fixation cérébrale assez similaires et permettent donc de cartographier la totalité des récepteurs 5-HT_{1A} chez l'Homme qu'ils soient fonctionnels ou non. Les régions de forte fixation de radiotraceurs correspondent aux aires limbiques telles que l'hippocampe et l'amygdale (Pike et al., 1995 ; Gunn et al., 1998 ; Costes et al., 2002). Ces antagonistes présentent aussi une fixation importante au niveau de certaines aires corticales comme le cortex cingulaire ou le cortex entorhinal. Des fixations plus modérées sont observées dans le septum latéral, les noyaux du raphé, le cortex insulaire et le cortex frontal. Les noyaux gris centraux présentent une fixation très faible. Le cervelet étant la région fixant le moins (ou ne fixant pas) ces radiotraceurs, il est souvent utilisé comme région de référence pour la quantification.

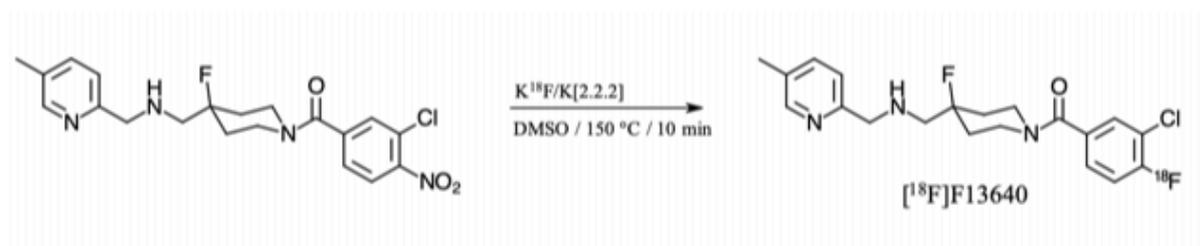
Les radiopharmaceutiques TEP agonistes des récepteurs 5-HT_{1A}

Le premier radiotraceur TEP agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} administré chez l'Homme a été le [¹¹C]CUMI-101, un dérivé arylpipérazine du [¹¹C]MPT (Milak et al., 2010 ; Kumar et al., 2006 ; Milak et al., 2008). Le [¹¹C]CUMI-101 a été utilisé dans plusieurs indications psychiatriques (Lan et al., 2022 ; Bartlett et al., 2023a ; Bartlett et al., 2023b ; Pantazatos et al., 2022 ; Melhem et al., 2022 ; Schneck et al., 2021 ; Ananth et al., 2020). Néanmoins, ce radiopharmaceutique présente plusieurs limites : en plus d'être radiomarqué au carbone 11 (ce qui limite son utilisation aux centres disposant d'un cyclotron), il s'est montré insensible aux fluctuations de sérotonine, avec de probables propriétés antagonistes, et possède vraisemblablement une affinité élevée pour les récepteurs adrénergiques α_1 (Selvaraj et al., 2012 ; Girgis et al., 2020 ; Pinborg et al., 2012 ; Milak et al., 2011 ; Shrestha et al., 2014 ; Selvaraj et al., 2015 ; Hendry et al., 2011).

C'est dans ce contexte que notre équipe a initialement radiomarqué au fluor 18 et évalué chez l'animal deux agonistes entiers et très spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A}, le [¹⁸F]F15599 et le [¹⁸F]F13714 (Lemoine et al., 2010 ; Lemoine et al., 2012). Malheureusement, les études TEP ont montré un rapport signal/bruit trop faible ou une fixation irréversible limitant l'intérêt de ces candidats radiotraceurs.

Nous avons choisi d'évaluer un autre agoniste issu de la même famille de composés, le **F13640**, aussi connu sous le nom de **befiradol** ou **NLX-112**, en cours de développement comme potentiel médicament. Les propriétés pharmacologiques du F13640 sont bien caractérisées, avec notamment une haute efficacité et spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et une bonne affinité ($K_D \sim 1$ nM) (Heusler et al., 2010).

A partir du précurseur ayant un groupement nitro (-NO₂), un radiomarquage au fluor 18 du F13640 est réalisé par substitution nucléophile aromatique (Figure 8).

Figure 8 : Schéma de synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$

Etudes *in vitro* du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$

La première étude autoradiographique avait pour objectif d'explorer les différences de couplage des récepteurs 5-HT_{1A} dans la maladie d'Alzheimer sur des coupes hippocampiques de cerveaux de patients (Vidal et al., 2016). Le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ était utilisé pour observer la part fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{1A}, tandis que le $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$, radiotracer antagoniste, était utilisé pour quantifier la part totale des récepteurs 5-HT_{1A} (couplés et non couplés). Les résultats ont montré une fixation spécifique des deux radiotraceurs au niveau hippocampique. L'ajout de Gpp(NH)p permettant le découplage des RCPG a entraîné une diminution de la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ mais pas de celle du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$, mettant ainsi en évidence la fixation préférentielle du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ pour les récepteurs fonctionnels. De plus, la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ s'est révélée significativement moins importante au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe au fur et à mesure de l'avancement de la pathologie (stade de Braak). Contrairement à un antagoniste qui se fixe à l'ensemble des récepteurs, un agoniste est capable d'imager une perte de fonctionnalité précoce des récepteurs. Cette étude a donc permis de valider que :

- 1/ en imagerie TEP, **les profils de fixation d'un antagoniste et agoniste 5-HT_{1A} sont différents en fonction de l'état de couplage des récepteurs** (le radiotracer agoniste se fixant préférentiellement à la part fonctionnelle), et
- 2/ que dans certaines pathologies, la **quantification des récepteurs couplés ou fonctionnels** à l'aide d'un agoniste 5-HT_{1A} pourrait être un **biomarqueur plus précoce** que la perte d'expression du récepteur lui-même.

Une autre étude a exploré la distribution cérébrale du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ chez le rat (Vidal et al., 2018). Des études autoradiographiques ont également été réalisées en présence de Gpp(NH)p pour évaluer le découplage des RCPG et également en présence de compétiteur (WAY-100635 ou sérotonine) pour valider la spécificité de la fixation. Les résultats ont montré une fixation importante du radiotracer au niveau des régions connues pour exprimer les 5-HT_{1A} et une diminution de la fixation dans ces mêmes régions lors des études de compétition et de découplage. Quasiment aucune fixation n'a été retrouvée au niveau du cervelet. Cette étude a donc permis d'obtenir une première **cartographie cérébrale des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels** chez le rat et de valider la **spécificité** du radiotracer.

Une seconde étude autoradiographique avec le [^{18}F]F13640 chez le chat a permis d'explorer la variabilité inter-espèces (Colom et al., 2021). Les résultats se sont avérés similaires à ceux observés chez le rat en termes de profil de fixation (importante au niveau cortex cingulaire et frontal et absente au niveau du cervelet) et de spécificité du radiotracer.

Données précliniques *in vivo* du [^{18}F]F13640

Des données en imagerie TEP au [^{18}F]F13640 ont été obtenues chez le rat et le PNH (Vidal et al., 2018). La fixation cérébrale *in vivo* du [^{18}F]F13640 chez le rat était différente à celle observée *in vitro* et de celle correspondant à l'expression connue des récepteurs 5-HT_{1A} : avec notamment une fixation importante au niveau du thalamus et du tronc cérébral, une fixation modérée au niveau hippocampique et une fixation élevée au niveau du noyau dorsal du raphé. Ces observations suggèrent une densité en récepteurs couplés fonctionnels différente de celle des récepteurs totaux. L'analyse des radiométabolites chez le rat a également permis de montrer qu'une part importante de la fixation cérébrale était due à du [^{18}F]F13640 sous forme inchangée.

Chez le PNH, la fixation était élevée au niveau du cortex cingulaire, de l'insula, de l'amygdale, du noyau du raphé dorsal et également au niveau hippocampique contrairement à ce qui a pu être observé chez le rat (Figure 9).

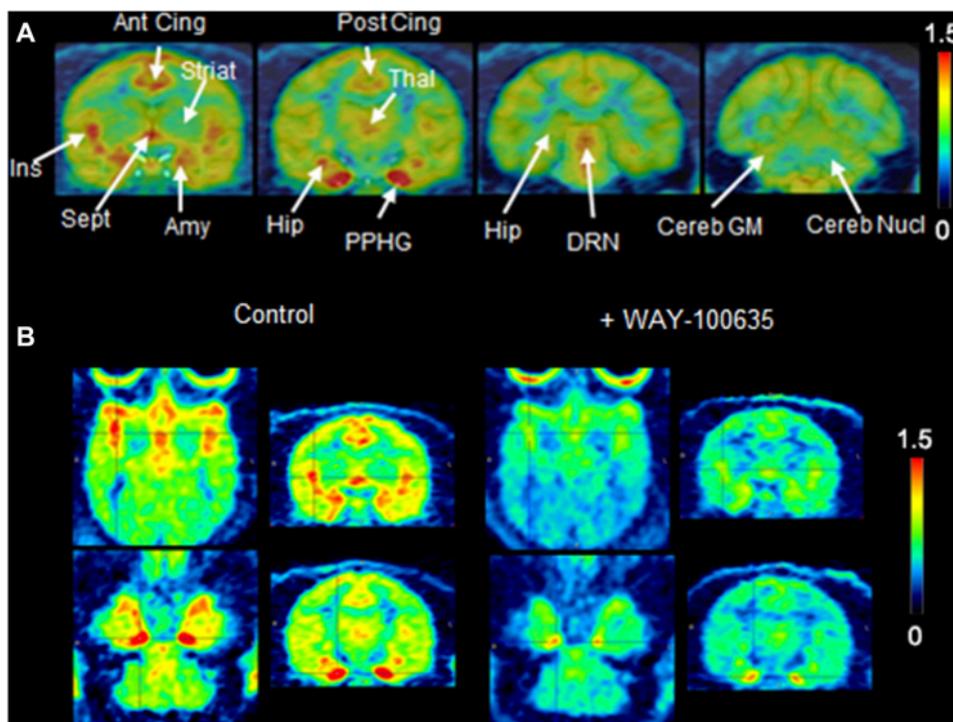


Figure 9 : Images TEP au [^{18}F]F13640 chez le PNH

(images sommes entre 60 et 180 minutes, coupes coronales et transverses projetées sur l'IRM) **A-** Contrôle **B-** Contrôle et compétition avec l'antagoniste WAY-100635 (2 mg/kg) (Vidal et al., 2018).

D'autre part, une fixation du [^{18}F]F13640 au niveau du cervelet a remis en question le principe d'absence totale de récepteurs 5-HT_{1A} dans cette région et l'utilisation du cervelet comme région de référence. L'hypothèse d'une fixation non-spécifique doit être écartée puisque ces régions ont toutes montré une diminution importante de la fixation après inhibition par un compétiteur (WAY-100635 ou 8-OH-DPAT). Ces données ont confirmé *in vivo* la haute spécificité du [^{18}F]F13640 pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Enfin, les courbes cinétiques observées chez les différentes espèces ont montré une fixation importante du radiotracer avec une cinétique d'élimination lente.

Une seconde étude TEP s'est intéressée à la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} chez le chat et à la sensibilité du [^{18}F]F13640 à la sérotonine endogène grâce à l'utilisation de fenfluramine (Colom et al., 2021). L'évaluation *in vivo* chez le chat a montré des résultats similaires à ceux observés chez le rat et le PNH. Une entrée rapide du [^{18}F]F13640 dans le cerveau, une cinétique lente et une distribution cérébrale comparable à celle observée chez les autres espèces. L'étude du challenge à la fenfluramine a montré une diminution importante de la fixation du radiotracer lorsqu'elle était administrée en pré-injection au [^{18}F]F13640 (30 min avant) et une légère diminution de la fixation lorsqu'elle était utilisée en post-injection au [^{18}F]F13640 (30 min après). Cette étude a permis de confirmer la distribution atypique du radiotracer du fait de ses propriétés d'agoniste. Également, cette étude vient confirmer la nécessité d'avoir des radiotraceurs agonistes plus sensibles aux fluctuations sérotoninergiques endogènes afin de pouvoir imager la neurotransmission.

Une troisième étude s'est intéressée à la différence de fixation entre radiotraceurs agoniste et antagoniste chez un modèle de rat hémi-parkinsoniens (HPK) et un modèle de rats dyskinétiques induits à la lévodopa (HPK-LID) (Vidal et al., 2021). Les rats ont réalisé deux examens d'imagerie TEP : l'un au [^{18}F]F13640 pour imager la part fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{1A} et l'autre au [^{18}F]MPPF pour imager l'expression totale des récepteurs. Les résultats ont montré une diminution significative de la fixation du [^{18}F]F13640 au niveau ipsilatéral à la lésion allant du globus pallidus au thalamus chez les rats HPK en comparaison des rats contrôles. Une augmentation de la fixation de [^{18}F]F13640 a également été retrouvée au niveau de plusieurs aires limbiques de l'hémisphère controlatéral (insula, hippocampe). Concernant les rats HPK-LID, des résultats similaires ont été retrouvés à un niveau moindre. La comparaison des rats HPK et HPK-LID a montré une augmentation de fixation du [^{18}F]F13640 chez les rats dyskinétiques au niveau cortical, du striatum droit et du thalamus (Figure 10). La fixation du [^{18}F]F13640 était cependant plus élevée chez les rats HPK au niveau de la substance noire, du paraflocculus du cervelet. Les résultats observés avec le [^{18}F]MPPF étaient différents de ceux observés avec le [^{18}F]F13640.

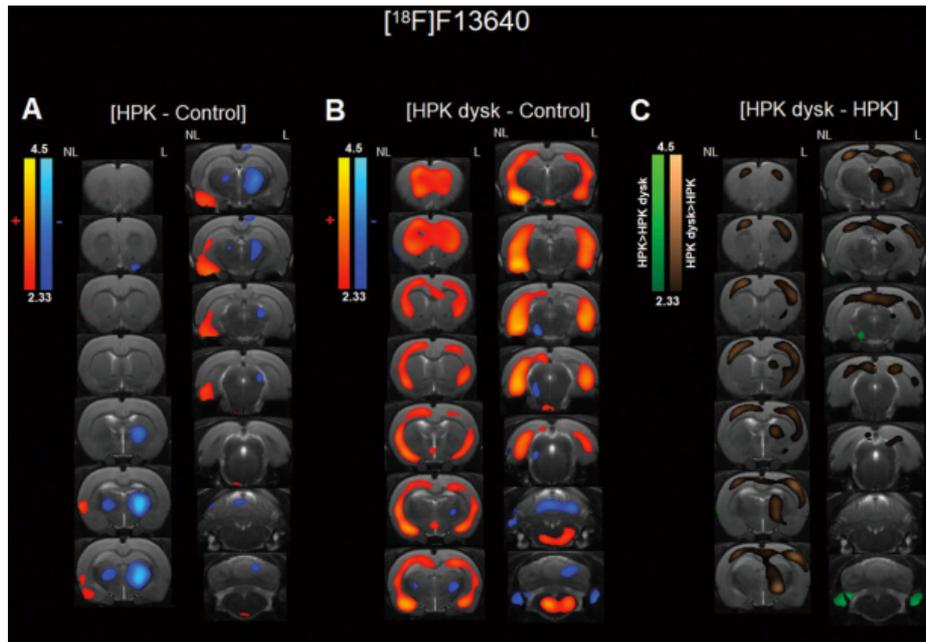


Figure 10 : Différence de fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ chez le modèle HPK ou HPK-LID

- A) Analyse de comparaison par voxel des BP_{ND} du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ entre rats HPK et contrôles
 B) Analyse de comparaison par voxel des BP_{ND} du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ entre rats HPK-LID et contrôles
 C) Analyse de comparaison par voxel des BP_{ND} du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ entre rats HPK et HPK-LID
 (Vidal et al., 2021).

La fixation du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ était diminuée seulement au niveau cortical chez les rats HPK. Chez les rats HPK-LID une diminution de fixation était observée au niveau cortical (aire somatosensorielle, motrice et entorhinal) et également au niveau du thalamus et du noyau du raphé. Quelques augmentations de fixation ont été décrites dans les deux modèles au niveau du cortex orbital uniquement. Ces différences confortent une fois de plus l'hypothèse de fixation différente entre radiotraceurs agoniste et antagoniste selon le couplage des RCPG. Également, ces différences peuvent être dues à une compétition avec la sérotonine endogène, puisque le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ en tant qu'agoniste est plus sensible aux fluctuations sérotoninergique (Colom et al., 2021).

D'autre part, cette étude renforce l'implication du système sérotoninergique dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies associées. Le befiradol (F13640 à dose pharmacologique) a déjà montré des résultats prometteurs dans les études précliniques (Depoortere et al., 2020 ; Iderberg et al., 2015) et est actuellement en étude de phase 2 (NCT05148884) pour traiter les dyskinésies induites par lévodopa. Le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ permet donc de cibler directement les récepteurs $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ engagés dans l'action pharmacologique de ce médicament.

Le [¹⁸F]F13640, agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels chez l'Homme

Les données précliniques *in vitro* et *in vivo* relatives au [¹⁸F]F13640 en tant que nouveau radiotracer agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} étant encourageantes, une étude de première administration chez l'Homme a été réalisée.

L'objectif principal de l'étude était de créer et valider un modèle compartimental *in vivo* de pharmacocinétique TEP du [¹⁸F]F13640 grâce à la combinaison de la mesure TEP et de la fonction d'entrée intra-artérielle du radiotracer.

Les objectifs secondaires étaient de valider un modèle simplifié de quantification non-invasif et d'évaluer la reproductibilité de la quantification de ces paramètres.

Annexe 4 : sélection d'article n°4 (en page 114)

Courault P, et al. [¹⁸F]F13640 as a PET radiopharmaceutical for functional 5-HT_{1A} receptor imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2023 Jan 19. doi: 10.1007/s00259-022-06103-1.

La validation de ce nouveau radiotracer chez l'Homme ouvre la voie vers d'**autres études de la fonctionnalité des récepteurs 5-HT_{1A} au cours de maladies neurologiques** (telles que les maladies neurodégénératives).

2. PERSPECTIVES, PROJETS DE RECHERCHE

2.1. POURSUITE DU DEVELOPPEMENT DU PREMIER RADIOTRACEUR TEP DES RECEPTEURS 5-HT₆

Malgré l'échec des thérapies dans la MA, le récepteur 5-HT₆ est un récepteur de la sérotonine dont les applications cliniques sont sous-exploitées. De nombreuses études montrent l'implication du récepteur 5-HT₆ dans l'obésité et la prise alimentaire (Fisas et al., 2006 ; Heal et al., 2011).

Dans l'obésité, la modification de la signalisation sérotoninergique observée chez l'homme, a fait apparaître certains récepteurs à la sérotonine comme cible thérapeutique il y a plus d'une décennie. Plusieurs médicaments sérotoninergiques à action centrale ont donné des résultats prometteurs chez l'homme souffrant d'obésité, mais leur utilisation est pour l'instant limitée car ils sont associés à des effets secondaires périphériques graves. Néanmoins, des recherches complémentaires sont nécessaires pour déterminer si ce système peut être ciblé en toute sécurité chez l'homme souffrant d'obésité.

Dans les troubles de la prise alimentaire, l'activité du récepteur 5-HT₆ a un impact sur la prise alimentaire et le poids dans divers modèles animaux. Ce récepteur est présenté comme

une cible potentielle pour le traitement de l'anhédonie, un symptôme du trouble dépressif majeur, et les troubles qui inhibent les processus motivationnels envers la consommation de nourriture (Anderson et al., 2023).

Ainsi, nous avons réalisé une étude dans un modèle d'obésité chez le rat (avec préinjection de tariquidar comme inhibiteur des P-gp) (article en cours de révision). Dans cette étude, nous avons effectué un suivi TEP longitudinal en utilisant le radiotracer $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ pour évaluer l'influence d'un régime gras et de l'obésité génétique sur la densité des récepteurs 5-HT₆ cérébraux. La principale constatation est que le régime gras augmente l'expression des récepteurs 5-HT₆ dans plusieurs régions telles que le striatum, le système limbique, les cortex cingulaire et temporal, et le tronc cérébral. De plus, nous avons montré que chez les rongeurs issus du modèle d'obésité génétique, les densités de récepteurs 5-HT₆ étaient constitutionnellement plus élevées que chez les autres groupes (groupe régime gras et groupe contrôle) dans l'amygdale, l'hippocampe et l'hypothalamus.

Ces résultats sont en accord avec les observations de la littérature précédemment citée et viennent confirmer l'intérêt du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ dans la compréhension des mécanismes impliquant les récepteurs 5-HT₆ dans l'obésité et la prise alimentaire.

En raison de leur localisation préférentielle dans le cerveau, les récepteurs 5-HT₆ sont également impliqués dans les maladies neuropsychiatriques pour lesquelles ils apparaissent comme des cibles thérapeutiques intéressantes (Arnt and Olsen, 2011 ; Wesolowska et al., 2021). Par exemple, Zajdel et al. (2021) ont récemment proposé un nouveau mécanisme d'action antipsychotique et pro-cognitif par une action non dopaminergique, basé sur les preuves que les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₆ améliorent la cognition lorsqu'ils sont administrés comme thérapie adjuvante aux antipsychotiques. Ils ont développé et testé un antagoniste à double action 5-HT₃/5-HT₆, le FPPQ, qui par le blocage simultané de ces deux récepteurs, est une nouvelle molécule candidate intéressante pour le traitement de la schizophrénie (Castane et al., 2022).

Ces nouvelles applications potentielles justifient pleinement la poursuite du développement du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ comme nouveau radiotracer des récepteurs 5-HT₆.

Notre objectif reste de réaliser **une étude de première administration du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ comme nouveau médicament radiopharmaceutique diagnostique** et d'explorer pour la première fois chez l'homme la distribution et la densité *in vivo* des récepteurs 5-HT₆.

Dans cette perspective, une étude de test-retest et de fonction d'entrée chez le modèle porc est en cours de réalisation. Ces données permettront d'alimenter les données précliniques et de valider un premier modèle compartimental *in vivo* de pharmacocinétique TEP du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ via la mesure TEP combinée à la fonction d'entrée intra-artérielle du radiotracer.

2.2. UTILISATION DU [¹⁸F]F13640 EN RECHERCHE CLINIQUE

La première utilisation clinique du [¹⁸F]F13640 fait actuellement l'objet d'un essai clinique dans l'algie vasculaire de la face épisodique (AVF).

L'AVF est une pathologie chronique qui se manifeste par des douleurs de la face extrêmement intenses et invalidantes pouvant conduire à des conduites suicidaires. Elle est définie par un tableau clinique stéréotypé et une rythmicité circadienne et circannuelle. Deux formes typiques existent : la forme chronique présente chez environ 15 % des patients et la forme épisodique retrouvée chez 85 % de patients.

Dans les formes épisodiques d'AVF, les périodes actives durent quelques semaines voire quelques mois souvent aux mêmes périodes de l'année, à l'automne ou au printemps. Ces périodes actives sont séparées par des périodes sans crises durant plus d'un mois. Pendant les périodes actives, les crises peuvent atteindre une fréquence de 8 par jour à des temps bien prédictibles. Les crises sont caractérisées par une douleur sévère à très sévère, strictement unilatérale, de localisation supraorbitaire et/ou temporale d'une durée de 15 à 180 minutes (Headache Classification Committee). Les crises sont associées à des symptômes dysautonomiques ipsilatéraux : larmoiements, injection conjonctivale et rhinorrhée. L'AVF survient essentiellement chez les hommes âgés en moyenne de 30 ans. Le diagnostic est essentiellement clinique, souvent d'exclusion, et aucun biomarqueur spécifique ou examen d'imagerie ne permet de poser un diagnostic de certitude. Les traitements sont séparés en trois groupes : traitements de crise, de prévention et de transition. Cependant, l'ensemble de ces traitements présentent des limites et laissent parfois les patients sans opportunité thérapeutique.

Quelle est l'implication de la sérotonine dans l'AVF ?

Les régions cérébrales impliquées dans l'AVF sont le système trigéminovasculaire, le système parasympathique et l'hypothalamus mais les mécanismes physiopathologiques de l'AVF restent mal connus (Hoffmann et al., 2018). En effet, l'origine du déclenchement de la crise et les régions cérébrales activées pendant la crise ne sont pas encore identifiées. Le système sérotoninergique joue un rôle majeur dans la régulation de la douleur au niveau cérébral et périphérique. Des études pharmacologiques suggèrent que la sérotonine joue un rôle majeur dans les crises d'AVF. L'une des études princeps a démontré en effet des concentrations basses de sérotonine dans le sang total et les plaquettes en dehors des périodes de crises (Waldenlind et al., 1985). Par la suite, des concentrations augmentées de sérotonine et de son métabolite 5-HIAA ont également été trouvés dans le plasma de patients pendant les crises et déclarés comme la conséquence d'un métabolisme sérotoninergique exacerbé (Nesbitt et al., 2012). L'implication des récepteurs à la sérotonine est aussi suggérée par la certaine efficacité thérapeutique de plusieurs agonistes 5-HT_{1A} comme les dérivés de l'ergot et les triptans (Robbins et al., 2016) dont les concepts physiopathologiques sont encore peu documentés et succincts. De plus, les récentes études

font émerger le potentiel de nouvelles thérapeutiques visant le système sérotoninergique (Courault et al., 2021).

Quelle est l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'AVF ?

L'hypothèse de l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'AVF repose sur trois constats : (i) l'implication de ces récepteurs dans les phénomènes de nociception, (ii) le développement de médicaments ciblant ces récepteurs dans un but antalgique et (iii) la présence de comorbidités impliquant le récepteur 5-HT_{1A} telle que la dépression et l'anxiété présente chez les patients AVF.

Concernant l'implication de la sérotonine dans les mécanismes nociceptifs, des études chez le rongeur suggèrent que la sérotonine module les réponses nociceptives (Kayser et al., 2007). Des souris mutées, dépourvues de différents sous-types de récepteurs à la sérotonine, dont les 5-HT_{1A} ont été exposées à différents stimuli nociceptifs. Les résultats ont révélé une corrélation entre l'expression du récepteur et le comportement lié à la douleur. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont aussi responsables de la médiation de l'effet antinociceptif de la sérotonine contre la douleur extracérébrale (Bannister et al., 2009). Parmi les médicaments développés à visée antalgique plusieurs présentent une affinité pour les 5-HT_{1A} ou un mécanisme d'action pouvant impliquer ces récepteurs (Mico et al., 2006). Les dérivés de l'ergot de seigle utilisés dans le traitement des migraines sont également connus pour avoir une affinité vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} (Hanoun et al., 2003). Plus récemment, le cannabidiol utilisé en thérapeutique pour traiter les douleurs neuropathiques sembleraient exercer leur action via les récepteurs 5-HT_{1A} (Mlost et al., 2020). Enfin, des molécules avec une haute sélectivité pour les récepteurs 5-HT_{1A} ont montré une action sur les mécanismes de nociception (Colpaert et al., 2002 ; Colpaert et al., 2006 ; Newman-Tancredi et al., 2018).

Concernant les comorbidités, les récepteurs 5-HT_{1A} sont impliqués dans les symptômes psycho-émotionnels tels que l'anxiété ou la dépression observés dans les crises d'AVF (Louter et al., 2016). De plus, le récepteur 5-HT_{1A} est aussi impliqué dans les phénomènes l'addiction (You et al., 2016 ; Müller et al., 2007), un trait couramment observé chez les patients atteints d'AVF (Govare et al., 2014).

Cependant, ces données ne démontrent pas directement le rôle des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'AVF, et des méthodes innovantes doivent être utilisées pour explorer le système sérotoninergique dans l'AVF.

Comment l'imagerie hybride TEP-IRM peut aider à la compréhension de la physiopathologie de l'AVF ?

Les études de neuroimagerie existantes concernant l'AVF ont principalement été conduites en IRM et IRM fonctionnelle (IRMf). Elles ont montré des résultats contrastés quant à l'altération du volume de l'hypothalamus chez les patients atteints d'AVF épisodique ou encore l'implication de cette structure cérébrale dans le déclenchement de la crise (Morelli et al., 2009 ; Matharu et al., 2010 ; May et al., 1999 ; Arkink et al., 2017 ; Absinta et al., 2012 ; Naegel et al., 2014 ; Yang et al., 2013). D'autres modifications structurelles et

volumétriques ont été observées au niveau du cortex visuel, du lobe temporal, de l'hippocampe, de l'insula et du cervelet (Seifert et al., 2012). L'intrication des différentes régions cérébrales semble être plus complexe et a fait l'objet de nombreuses études en IRMf (Rocca et al., 2010 ; Qiu et al., 2013 ; Yang et al., 2015 ; Qiu et al., 2015 ; Ferraro et al., 2018). Ainsi, d'autres régions ont également été décrites comme altérées dans l'AVF comme le cortex visuel (Chou et al., 2017) les réseaux attentionnel (gyrus frontal supérieur et frontal cortex) et le cervelet (Farago et al., 2017). Les zones décrites dans le traitement de l'information douloureuse ont également été retrouvées en IRMf et une diminution de connectivité fonctionnelle a été observée entre le réseau sensori-moteur et les aires somatosensorielles le cortex cingulaire antérieur et l'aire motrice supplémentaire (Rocca et al., 2010 ; Chou et al., 2017).

Les quelques études d'imagerie TEP avec l' $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ ou le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ont été les premières à mettre en évidence le rôle de l'hypothalamus comme centre déclencheur de la crise (May et al., 1998 ; May et al., 2000 ; Sprenger et al., 2004 ; Sprenger et al., 2007). Des études avec des radiotraceurs plus spécifiques ont également montré une diminution de l'expression des récepteurs opioïdes au niveau de la glande pinéale et de l'hypothalamus (Sprenger et al., 2006). Des études TEP au $[^{15}\text{O}]\text{butanol}$ permettant de mesurer le débit sanguin cérébral ont également permis de mettre en évidence des altérations, lors de crises induites, au niveau de régions impliquées dans le traitement de la douleur (cortex cingulaire, insula,...) (Hsieh et al., 1996). Enfin, l'imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ a également montré une augmentation du métabolisme du glucose dans ces régions cérébrales et une diminution du métabolisme au niveau de l'angle ponto-cérébelleux (Sprenger et al., 2007).

Dans notre **étude AVF-F13640**, nous proposons l'**exploration de la physiopathologie de l'AVF** avec l'**acquisition simultanée TEP-IRM** à l'aide de notre machine hybride pour combiner d'une part l'**exploration TEP** des récepteurs 5-HT_{1A} avec le premier radiotraceur agoniste pur, le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ se liant spécifiquement aux récepteurs fonctionnels, et d'autre part l'**exploration par l'IRM** de l'activation cérébrale, la connectivité fonctionnelle et la perfusion.

L'utilisation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ permettra pour la première fois de mettre en évidence la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels dans les périodes inactives ou actives et durant les phases de crise et inter-crise de l'AVF.

Dans ce contexte, nous proposons d'évaluer les différences de fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ en TEP et les modifications dans les paramètres mesurés en IRM :

- 1/ chez les patients AVF en période inactive et en période active ;
- 2/ chez les patients AVF lors de la période active pendant les phases de crises et d'inter-crisis (avant, pendant et après la crise à la suite de l'administration de sumatriptan, un agoniste 5-HT₁ efficace pour calmer les crises). Les crises d'AVF se déclenchant tous les jours à la même heure, nous avons élaboré un protocole permettant d'explorer différentes

phases de l'AVF. Enfin, l'administration de sumatriptan pendant la crise donne l'opportunité d'élucider son mécanisme thérapeutique ;

3/ chez les patients AVF en comparaison à des sujets contrôles dont les données ont été préalablement obtenues lors de l'étude de première administration précitée.

Notre objectif principal est d'évaluer la différence, chez un groupe de patients atteints d'AVF épisodique :

- de fixation du [¹⁸F]F13640 (pour les données TEP),
- de perfusion, d'activité cérébrale et de connectivité fonctionnelle (pour les données IRM)

entre la période active et inactive de la maladie.

Avec les données TEP, nous espérons évaluer :

- la disponibilité des récepteurs 5-HT_{1A} chez les patients en période active en phase de crise et inter-crise ;
- la différence de densité de récepteurs fonctionnels 5-HT_{1A} des patients en période inactive par rapport aux contrôles ;
- la différence de densité de récepteurs fonctionnels 5-HT_{1A} des patients en période active en phase de crise et inter-crise par rapport au groupe contrôle.

Les données IRM doivent permettre de :

- Evaluer l'activité cérébrale chez les patients en période active en phase de crise et inter-crise (IRMf d'activation) ;
- Comparer la perfusion cérébrale et des réseaux de connectivité fonctionnelle (IRMf) entre patients en période inactive par rapport au groupe contrôle ;
- Comparer la perfusion cérébrale et des réseaux de connectivité fonctionnelle (IRMf) chez les patients en période active en phase de crise et inter-crise et par rapport au groupe contrôle.

Pour cette étude, **8 patients atteints d'AVF épisodiques** sont attendus. Ils participeront à deux sessions d'imagerie TEP-IRM avec le [¹⁸F]F13640, dont une session **en phase inactive** et une autre **en phase active**.

Cette étude exploratoire en imagerie TEP au [¹⁸F]F13640 chez le patient atteint d'AVF permettra d'obtenir de manière non invasive une cartographie régionale *in vivo* des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. Les données obtenues devraient permettre d'améliorer la compréhension du rôle de ces récepteurs dans les mécanismes de l'AVF constituant un enjeu important d'un point de vue physiopathologique. Ces nouvelles données d'imagerie, combinées aux données cliniques, permettront éventuellement d'élucider en partie le mécanisme d'action du sumatriptan et de développer de nouvelles options ou cibles thérapeutiques.

2.3. ETUDE DU ROLE DE LA SEROTONINE DANS LA DEGENERESCENCE FRONTO-TEMPORALE (DFT)

Le dysfonctionnement du système sérotoninergique contribue de manière significative aux symptômes comportementaux et cognitifs observés dans la dégénérescence fronto-temporale (DFT) (Huey et al., 2006 ; Hughes et al., 2015). Les déficits de la transmission de la sérotonine ou des densités de récepteurs postsynaptiques, notamment des récepteurs 5-HT_{2A}, sont associés à certains symptômes, notamment l'agressivité, l'impulsivité ou les troubles alimentaires (Huey et al., 2006 ; Franceschi et al. 2005). De même, le polymorphisme du transporteur de la sérotonine semble être associé à une susceptibilité *via-à-vis* de la DFT (Albani et al., 2008). La modulation du tonus sérotoninergique par les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) ou la trazodone permet d'améliorer certains symptômes cognitifs ou comportementaux ainsi que la qualité de vie (Huey et al., 2006 ; Lebert et al., 2004). Ces travaux cliniques d'imagerie *in vivo* et ces données neuropathologiques suggèrent que la sérotonine pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la DFT. Cependant, les mécanismes physiopathologiques et thérapeutiques restent méconnus.

Peu d'études décrivent le tonus sérotoninergique dans le variant comportemental de la DFT. Elles sont le plus souvent anciennes, avec des effectifs restreints et des critères diagnostiques ne tenant pas compte des classifications diagnostiques actuelles.

Néanmoins, une diminution des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} en *post mortem* a été rapportée dans les lobes frontaux et temporaux et dans l'hypothalamus chez ces patients (Sparks et al., 1991 ; Francis et al., 1993 ; Procter et al., 1999 ; Bowen et al., 2008). Une étude en *in vivo* en TEP a également montré une diminution du potentiel de liaison des récepteurs 5-HT_{2A} dans le mésencéphale et le cortex frontal médian (Franceschi et al., 2005). A notre connaissance, le statut des transporteurs de la sérotonine n'a jamais été exploré dans la DFT.

En 2022, nous avons obtenu un financement de la Fondation Alzheimer pour investiguer le rôle de la sérotonine dans la DFT.

L'objectif principal est de comparer le fonctionnement du système sérotoninergique cérébral entre un groupe de patients atteints de DFT par rapport à un groupe de sujets sains (contrôles) afin de mieux comprendre l'implication du système sérotoninergique dans les symptômes comportementaux.

Nous proposons une étude d'imagerie fonctionnelle en TEP-IRM avec le [¹¹C]DASB (traceur pré-synaptique du transporteur de la recapture de la sérotonine, SERT) et l' [¹⁸F]altansérine (traceur post-synaptique des récepteurs 5-HT_{2A}).

Ces données d'imagerie fonctionnelles seront complétées par 1/ des données d'imagerie IRM anatomiques et fonctionnelles, 2/ des évaluations cliniques et comportementales et 3/ des évaluations biologiques (dosages des neurofilaments) et pharmacogénétiques.

L'origine de ce projet provient de la volonté d'associer non seulement le personnel des versants imagerie et biochimie clinique au sein de l'équipe BIORAN mais également des cliniciens proches de l'équipe autour d'un projet commun.

L'étude permettra d'identifier de façon spécifique les altérations du tonus sérotoninergique liées à la DFT et de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Ce travail pourra ouvrir la voie vers de futures études longitudinales en imagerie sur la densité des récepteurs, y compris les récepteurs 5-HT_{1A}, pour modéliser la progression de la maladie et les éventuels changements fonctionnels compensatoires en fonction du stade de la DFT.

A plus long terme, cette étude, et en cas de succès les suivantes, pourraient 1/ aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes d'action et d'efficacité des traitements ciblant spécifiquement le tonus sérotoninergique et 2/ permettre de proposer une médecine personnalisée en identifiant la thérapeutique la plus efficace, les sujets répondeurs et les bonnes indications (stade/symptômes prédominants).

3. CONCLUSION

Grâce aux radiotraceurs, l'imagerie moléculaire cérébrale permet la mesure et la quantification non invasives de protéines, récepteurs et transporteurs, de leurs affinités de liaison et des voies métaboliques physiopathologiques. L'ensemble des travaux de recherche présentés dans ce mémoire a pour objectif commun le développement de radiotraceurs pour l'imagerie TEP en neurologie. Ils reflètent bien les difficultés de conception et de translation des résultats d'une espèce à l'autre.

Les projets exposés m'ont permis d'acquérir des compétences en radiochimie, dans la validation biologique et dans le développement de méthodes permettant l'évaluation préclinique de ces molécules puis le transfert chez l'Homme de médicaments expérimentaux.

En lien avec mon activité hospitalière, une partie de mon projet de recherche est orientée sur la recherche clinique TEP avec ces nouveaux biomarqueurs. Parmi ces projets, certains sont déjà en cours comme la poursuite du développement du [¹⁸F]2FNQ1P et le développement des applications du [¹⁸F]F13640 dans l'algie vasculaire de la face. Mon objectif est également de poursuivre l'étude des mécanismes physiopathologiques moléculaires de maladies neurologiques telles que les maladies neurodégénératives grâce à l'imagerie TEP avec des radiotraceurs innovants.

4. BIBLIOGRAPHIE

Absinta M, Rocca MA, Colombo B, et al. Selective decreased grey matter volume of the pain-matrix network in cluster headache. *Cephalalgia* (2012); 32: 109–115.

Alafuzoff I, Libard S. Mixed Brain Pathology Is the Most Common Cause of Cognitive Impairment in the Elderly. *J Alzheimers Dis.* 2020;78(1):453-465. doi: 10.3233/JAD-200925.

Albani D, Prato F, Fenoglio C, Batelli S, Dusi S, et al. Association study to evaluate the serotonin transporter and apolipoprotein E genes in frontotemporal lobar degeneration in Italy. *J Hum Genet.* 2008;53(11-12):1029-1033. doi: 10.1007/s10038-008-0344-5.

Albizu L, Moreno JL, González-Maeso J, Sealton SC. Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Nov;9(5):636-50. doi: 10.2174/187152710793361586

Ananth M, Bartlett EA, DeLorenzo C, Lin X, Kunkel L, et al. Prediction of lithium treatment response in bipolar depression using 5-HTT and 5-HT1A PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2020 Sep;47(10):2417-2428. doi: 10.1007/s00259-020-04681-6.

Anderson GE, Sharp A, Pratt WE. Stimulation of nucleus accumbens 5-HT6 receptors increases both appetitive and consummatory motivation in an effort-based choice task. *Neuroreport,* 2023 Feb 1;34(2):116-121. doi: 10.1097/WNR.0000000000001868.

Arkink EB, Schmitz N, Schoonman GG, et al. The anterior hypothalamus in cluster headache. *Cephalalgia* (2017); 37: 1039–1050.

Arnt J, Olsen CK. 5-HT6 receptor ligands and their antipsychotic potential. *Int Rev Neurobiol.* 2011;96:141-61. doi: 10.1016/B978-0-12-385902-0.00006-1.

Atri A, Frölich L, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, et al. Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease: Three Randomized Clinical Trials. *JAMA.* 2018 Jan 9;319(2):130-142. doi: 10.1001/jama.2017.20373.

Aznavour N, Zimmer L. [18F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT1A receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology.* 2007 Mar;52(3):695-707. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.09.023.

Bagchi DP, Yu L, Perlmutter JS, Xu J, Mach RH, Tu Z, Kotzbauer PT. Binding of the radioligand SIL23 to α -synuclein fibrils in Parkinson disease brain tissue establishes feasibility and screening approaches for developing a Parkinson disease imaging agent. *PLoS One.* 2013;8(2):e55031. doi: 10.1371/journal.pone.0055031.

Bannister K, Bee LA, Dickenson AH. Preclinical and early clinical investigations related to monoaminergic pain modulation. *Neurotherapeutics* (2009); 6: 703–712.

Bartlett EA, Zanderigo F, Stanley B, et al. In vivo serotonin transporter and 1A receptor binding potential and ecological momentary assessment (EMA) of stress in major depression and suicidal behavior. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 2023a ; 70: 1–13.

Bartlett EA, Yttredahl AA, Boldrini M, Tyrer AE, Hill KR, et al. In vivo serotonin 1A receptor hippocampal binding potential in depression and reported childhood adversity. *Eur Psychiatry.* 2023b Jan 24;66(1):e17. doi: 10.1192/j.eurpsy.2023.4.

Becker G, Colomb J, Sgambato-Faure V, Tremblay L, Billard T, Zimmer L. Preclinical evaluation of [18F]2FNQ1P as the first fluorinated serotonin 5-HT₆ radioligand for PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015 Mar;42(3):495-502. doi: 10.1007/s00259-014-2936-y.

Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of α -synuclein. *Neuron.* 2013 Sep 18;79(6):1044-66. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.004.

Benhamú B, Martín-Fontecha M, Vázquez-Villa H, Pardo L, López-Rodríguez ML. Serotonin 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of cognitive deficiency in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2014 Sep 11;57(17):7160-81. doi: 10.1021/jm5003952.

Björk K, Svenningsson P. Modulation of Monoamine Receptors by Adaptor Proteins and Lipid Rafts: Role in Some Effects of Centrally Acting Drugs and Therapeutic Agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2011); 51: 211–242.

Bowen DM, Procter AW, Mann DM, Snowden JS, Esiri MM, et al. Imbalance of a serotonergic system in frontotemporal dementia: implication for pharmacotherapy. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Mar;196(4):603-10. doi: 10.1007/s00213-007-0992-8.

Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Feb;16(2):109-20. doi: 10.1038/nrn3887.

Butler B, Sambo D, Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *J Chem Neuroanat.* 2017 Oct;83-84:41-49. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.06.001.

Cassinelli Petersen G, Roytman M, Chiang GC, Li Y, Gordon ML, Franceschi AM. Overview of tau PET molecular imaging. *Curr Opin Neurol.* 2022 Apr 1;35(2):230-239. doi: 10.1097/WCO.0000000000001035.

Castañé A, Cano M, Ruiz-Avila L, Miquel-Rio L, Celada P, et al. Dual 5-HT₃ and 5-HT₆ Receptor Antagonist FPPQ Normalizes Phencyclidine-Induced Disruption of Brain Oscillatory Activity in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2022 May 27;25(5):425-431. doi: 10.1093/ijnp/pyac003.

Chopra, A. (2004). [11C]-[N-Methyl]3-[(3-fluorophenyl)sulfonyl]-8-(4-methyl-1-piperazinyl)quinoline. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).

Chou KH, Yang FC, Fuh JL, Kuo CY, Wang YH, et al. Bout-associated intrinsic functional network changes in cluster headache: A longitudinal resting-state functional MRI study. *Cephalalgia*. 2017 Oct;37(12):1152-1163. doi: 10.1177/0333102416668657

Chu W, Zhou D, Gaba V, Liu J, Li S, et al. Design, Synthesis, and Characterization of 3-(Benzylidene)indolin-2-one Derivatives as Ligands for α -Synuclein Fibrils. *J Med Chem*. 2015 Aug 13;58(15):6002-17. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00571.

Claeyssen S, Bockaert J, Giannoni P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem Neurosci*. 2015 Jul 15;6(7):940-3. doi: 10.1021/acschemneuro.5b00135.

Codony X, Vela JM, Ramírez MJ. 5-HT(6) receptor and cognition. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Feb;11(1):94-100. doi: 10.1016/j.coph.2011.01.004.

Colom M, Vidal B, Fieux S, Redoute J, Costes N, et al. 18F]F13640, a 5-HT1A Receptor Radiopharmaceutical Sensitive to Brain Serotonin Fluctuations. *Front Neurosci*. 2021 Mar 8;15:622423. doi: 10.3389/fnins.2021.622423.

Colom M, Vidal B, Zimmer L. Is There a Role for GPCR Agonist Radiotracers in PET Neuroimaging? *Front Mol Neurosci* (2019); 12: 255.

Colomb J, Becker G, Fieux S, Zimmer L, Billard T. Syntheses, radiolabelings, and in vitro evaluations of fluorinated PET radioligands of 5-HT6 serotonergic receptors. *J Med Chem*. 2014 May 8;57(9):3884-90. doi: 10.1021/jm500372e.

Colpaert FC. 5-HT(1A) receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2006 ; 7: 40–47.

Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, et al. Large-amplitude 5-HT1A receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology*. 2002 Nov;43(6):945-58. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00119-3.

Costes N, Merlet I, Zimmer L, Lavenne F, Cinotti L, Delforge J, Luxen A, Pujol JF, Le Bars D. Modeling [18 F]MPPF positron emission tomography kinetics for the determination of 5-hydroxytryptamine(1A) receptor concentration with multiinjection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Jun;22(6):753-65. doi: 10.1097/00004647-200206000-00014.

Courault P, Demarquay G, Zimmer L, Lancelot S. Cluster headache: state of the art of pharmacological treatments and therapeutic perspectives. *Fundam Clin Pharmacol* (2021); 35: 595–619. doi: 10.1111/fcp.12636

Courault P, Emery S, Bouvard S, Liger F, Chauveau F, et al. Change in Expression of 5-HT6 Receptor at Different Stages of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study with the

PET Radiopharmaceutical [18F]2FNQ1P. *J Alzheimers Dis.* 2020;75(4):1329-1338. doi: 10.3233/JAD-191278.

Dayer AG, Jacobshagen M, Chaumont-Dubel S, Marin P. 5-HT6 Receptor: A New Player Controlling the Development of Neural Circuits. *ACS Chem Neurosci.* 2015 Jul 15;6(7):951-60. doi: 10.1021/cn500326z.

Declercq LD, Vandenberghe R, Van Laere K, Verbruggen A, Bormans G. Drug Development in Alzheimer's Disease: The Contribution of PET and SPECT. *Front Pharmacol.* 2016 Mar 31;7:88. doi: 10.3389/fphar.2016.00088. eCollection 2016.

Depoortere R, Johnston TH, Fox SH, Brotchie JM, Newman-Tancredi A. The selective 5-HT1A receptor agonist, NLX-112, exerts anti-dyskinetic effects in MPTP-treated macaques. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020 Sep;78:151-157. doi: 10.1016/j.parkreldis.2020.08.009.

Derry C, Benjamin C, Bladin P, le Bars D, Tochon-Danguy H, et al. Increased serotonin receptor availability in human sleep: evidence from an [18F]MPPF PET study in narcolepsy. *Neuroimage.* 2006 Apr 1;30(2):341-8. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.09.052.

Eberling JL, Dave KD, Frasier MA. α -synuclein imaging: a critical need for Parkinson's disease research. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):565-7. doi: 10.3233/JPD-130247.

Emery S, Fieux S, Vidal B, Courault P, Bouvard S, et al. Preclinical validation of [18F]2FNQ1P as a specific PET radiotracer of 5-HT6 receptors in rat, pig, non-human primate and human brain tissue. *Nucl Med Biol.* 2020 Jan 22;82-83:57-63. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2020.01.006.

Factor SA, McDonald WM, Goldstein FC. The role of neurotransmitters in the development of Parkinson's disease-related psychosis. *Eur J Neurol.* 2017 Oct;24(10):1244-1254. doi: 10.1111/ene.13376.

Fairfoul G, McGuire LI, Pal S, Ironside JW, Neumann J, et al. Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016 Aug 28;3(10):812-818. doi: 10.1002/acn3.338.

Faragó P, Szabó N, Tóth E, et al. Ipsilateral Alteration of Resting State Activity Suggests That Cortical Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Cluster Headache. *Brain Topogr* (2017); 30: 281–289.

Ferraro S, Nigri A, Bruzzone MG, Brivio L, Proietti Cecchini A, et al. Defective functional connectivity between posterior hypothalamus and regions of the diencephalic-mesencephalic junction in chronic cluster headache. *Cephalalgia.* 2018 Nov;38(13):1910-1918. doi: 10.1177/0333102418761048.

Ferrero H, Solas M, Francis PT, Ramirez MJ. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: Therapeutic Rationale and Current Development Status CNS Drugs. 2017 Jan;31(1):19-32. doi: 10.1007/s40263-016-0399-3.

Ferrie JJ, Lengyel-Zhand Z, Janssen B, Lougee MG, Giannakoulis S, et al. Identification of a nanomolar affinity α -synuclein fibril imaging probe by ultra-high throughput in silico screening. Chem Sci. 2020 Sep 10;11(47):12746-12754. doi: 10.1039/d0sc02159h.

Fisas A, Codony X, Romero G, Dordal A, Giraldo J, et al. Chronic 5-HT₆ receptor modulation by E-6837 induces hypophagia and sustained weight loss in diet-induced obese rats. Br J Pharmacol. 2006 Aug;148(7):973-83. doi: 10.1038/sj.bjp.0706807.

Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, et al. In vitro characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. Eur J Pharmacol. 2009 Sep 1;617(1-3):54-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.042.

Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, et al. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. Brain. 2011 Apr;134(Pt 4):1089-100. doi: 10.1093/brain/awr038.

Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, et al. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. Eur J Pharmacol. 1995 Jul 25;281(1):81-8. doi: 10.1016/0014-2999(95)00234-c.

Franceschi M, Anchisi D, Pelati O, Zuffi M, Matarrese M, et al. Glucose metabolism and serotonin receptors in the frontotemporal lobe degeneration. Ann Neurol. 2005 Feb;57(2):216-25. doi: 10.1002/ana.20365.

Francis PT, Holmes C, Webster MT, Stratmann GC, Procter AW, Bowen DM. Preliminary neurochemical findings in non-Alzheimer dementia due to lobar atrophy. Dementia. 1993 May-Aug;4(3-4):172-7. doi: 10.1159/000107319.

Frölich L, Atri A, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, et al. Open-Label, Multicenter, Phase III Extension Study of Idalopirdine as Adjunctive to Donepezil for the Treatment of Mild-Moderate Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2019;67(1):303-313. doi: 10.3233/JAD-180595.

Girgis RR, Forbes A, Abi-Dargham A, Slifstein M. A positron emission tomography occupancy study of brexpiprazole at dopamine D₂ and D₃ and serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, and serotonin reuptake transporters in subjects with schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 2020 Apr;45(5):786-792. doi: 10.1038/s41386-019-0590-6.

Govare A, Leroux E. Licit and illicit drug use in cluster headache. Curr Pain Headache Rep (2014); 18: 413.

Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol*. 1995 Jan 16;288(2):173-86. doi: 10.1016/0922-4106(95)90192-2.

Gravius A, Laszy J, Pietraszek M, Sághy K, Nagel J, et al. Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol*. 2011 Apr;22(2):122-35. doi: 10.1097/FBP.0b013e328343d804.

Grychowska K, Satała G, Kos T, Partyka A, Colacino E, et al. Novel 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinoline Based 5-HT₆ Receptor Antagonists with Potential Application for the Treatment of Cognitive Disorders Associated with Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2016 Jul 20;7(7):972-83. doi: 10.1021/acschemneuro.6b00090.

Gunn RN, Sargent PA, Bench CJ, Rabiner EA, Osman S, et al. Tracer kinetic modeling of the 5-HT_{1A} receptor ligand [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 for PET. *Neuroimage*. 1998 Nov;8(4):426-40. doi: 10.1006/ning.1998.0379.

Han JY, Jang HS, Green AJE, Choi YP. RT-QuIC-based detection of alpha-synuclein seeding activity in brains of dementia with Lewy Body patients and of a transgenic mouse model of synucleinopathy. *Prion*. 2020 Dec;14(1):88-94. doi: 10.1080/19336896.2020.1724608.

Hanoun N, Saurini F, Lanfumey L, Hamon M, Bourgoin S. Dihydroergotamine and its metabolite, 8'-hydroxy-dihydroergotamine, as 5-HT_{1A} receptor agonists in the rat brain. *Br J Pharmacol*. 2003 May;139(2):424-34. doi: 10.1038/sj.bjp.0705258.

Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Dec;16(12):829-842. doi: 10.1038/nrd.2017.178.

Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* (2018); 38: 1–211.

Heal D, Gosden J, Smith S. The 5-HT₆ receptor as a target for developing novel antiobesity drugs. *Int Rev Neurobiol*. 2011;96:73-109. doi: 10.1016/B978-0-12-385902-0.00004-8.

Hendry N, Christie I, Rabiner EA, Laruelle M, Watson J. In vitro assessment of the agonist properties of the novel 5-HT_{1A} receptor ligand, CUMI-101 (MMP), in rat brain tissue. *Nucl Med Biol*. 2011 Feb;38(2):273-7. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2010.08.003.

Hesselgrave N, Parsey RV. Imaging the serotonin 1A receptor using [¹¹C]WAY100635 in healthy controls and major depression. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* (2013); 368: 20120004.

Heusler P, Palmier C, Tardif S, Bernois S, Colpaert FC, Cussac D. [(3)H]-F13640, a novel, selective and high-efficacy serotonin 5-HT(1A) receptor agonist radioligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010 Oct;382(4):321-30. doi: 10.1007/s00210-010-0551-4.

Hoffmann J, May A. Diagnosis, pathophysiology, and management of cluster headache. *Lancet Neurol* (2018); 17: 75–83.

Hsieh J-C, Hannerz J, Ingvar M. Right-lateralised central processing for pain of nitroglycerin-induced cluster headache. *Pain* (1996); 67: 59–68.

Huey ED, Putnam KT, Grafman J. A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia. *Neurology* 2006 Jan 10;66:17-22.

Hughes LE, Rittman T, Regenthal R, Robbins TW, Rowe JB. Improving response inhibition systems in frontotemporal dementia with citalopram. *Brain.* 2015 Jul;138(Pt 7):1961-75. doi: 10.1093/brain/awv133.

Hwang DR, Simpson NR, Montoya J, Man JJ, Laruelle M. An improved one-pot procedure for the preparation of [11C-carbonyl]-WAY100635. *Nucl Med Biol.* 1999 Oct;26(7):815-9. doi: 10.1016/s0969-8051(99)00056-6.

Iderberg H, McCreary AC, Varney MA, Kleven MS, Koek W, et al. NLX-112, a novel 5-HT1A receptor agonist for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. *Exp Neurol.* 2015 Sep;271:335-50. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.05.021.

Ito S, Suhara T, Ito H, Yasuno F, Ichimiya T, et al. Changes in central 5-HT(1A) receptor binding in mesial temporal epilepsy measured by positron emission tomography with [(11)C]WAY100635. *Epilepsy Res.* 2007 Jan;73(1):111-8. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2006.09.003.

Jastrzebska B, Debinski A, Filipek S, Palczewski K. Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function. *Prog Lipid Res.* 2011 Jul;50(3):267-77. doi: 10.1016/j.plipres.2011.03.002.

Jellinger KA. Interaction between α -synuclein and other proteins in neurodegenerative disorders. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1893-907. doi: 10.1100/2011/371893.

Josephson L, Stratman N, Liu Y, Qian F, Liang SH, et al. The Binding of BF-227-Like Benzoxazoles to Human α -Synuclein and Amyloid β Peptide Fibrils. *Mol Imaging.* 2018 Jan-Dec;17:1536012118796297. doi: 10.1177/1536012118796297.

Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2013 Sep 5;501(7465):45-51. doi: 10.1038/nature12481.

Kaide S, Watanabe H, Shimizu Y, Iikuni S, Nakamoto Y, et al. Identification and Evaluation of Bisquinoline Scaffold as a New Candidate for α -Synuclein-PET Imaging. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Dec 16;11(24):4254-4261. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00523.

Kallinen A, Kassiou M. Tracer development for PET imaging of proteinopathies. *Nucl Med Biol*. 2022 Nov-Dec;114-115:108-120. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2022.04.001.

Karila D, Freret T, Bouet V, Boulouard M, Dallemagne P, Rochais C. Therapeutic Potential of 5-HT₆ Receptor Agonists. *J Med Chem*. 2015 Oct 22;58(20):7901-12. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00179.

Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, et al. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{3A}^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain*. 2007 Aug;130(3):235-248. doi: 10.1016/j.pain.2006.11.015.

Kenakin T. Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism: Who Steers the Ship? *Mol Pharmacol* (2007); 72: 1393–1401.

Kepe V, Barrio JR, Huang SC, Ercoli L, Siddarth P, et al. Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):702-7. doi: 10.1073/pnas.0510237103.

Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, et al. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain*. 2010 Jun;133(Pt 6):1772-8. doi: 10.1093/brain/awq091.

Klunk WE, Mathis CA. Whatever happened to Pittsburgh Compound-A? *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2008 Jul-Sep;22(3):198-203. doi: 10.1097/WAD.0b013e318188c0c8.

Korat Š, Bidesi NSR, Bonanno F, Di Nanni A, Hoàng ANN, et al. Alpha-Synuclein PET Tracer Development-An Overview about Current Efforts. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Aug 26;14(9):847. doi: 10.3390/ph14090847.

Khoury R, Grysman N, Gold J, Patel K, Grossberg GT. The role of 5 HT₆-receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 Jun;27(6):523-533. doi: 10.1080/13543784.2018.1483334.

Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, et al. 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med*. 2007 Apr;48(4):553-61. doi: 10.2967/jnumed.106.037556.

Kuebler L, Buss S, Leonov A, Ryazanov S, Schmidt F, et al. [11C]MODAG-001-towards a PET tracer targeting α -synuclein aggregates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Jun;48(6):1759-1772. doi: 10.1007/s00259-020-05133-x.

Kumar JS, Majo VJ, Hsiung SC, Millak MS, Liu KP, et al. Synthesis and in vivo validation of [O-methyl-11C]2-{4-[4-(7-methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl}-4-methyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione: a novel 5-HT1A receptor agonist positron emission tomography ligand. *J Med Chem*. 2006 Jan 12;49(1):125-34. doi: 10.1021/jm050725j.

Lan MJ, Zanderigo F, Pantazatos SP, Sublette ME, Miller J, et al. Serotonin 1A Receptor Binding of [11C]CUMI-101 in Bipolar Depression Quantified Using Positron Emission Tomography: Relationship to Psychopathology and Antidepressant Response. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2022 Aug 4;25(7):534-544. doi: 10.1093/ijnp/pyac001.

Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Sep;31(9):411-7. doi: 10.1016/j.tips.2010.06.002.

Lanctôt KL, Herrmann N, Ganjavi H, Black SE, Rusjan PM, et al. Serotonin-1A receptors in frontotemporal dementia compared with controls. *Psychiatry Res*. 2007 Dec 15;156(3):247-50. doi: 10.1016/j.psychres.2007.07.003.

Lebert F, Stekke W, Hasenbroekx C, Pasquier F. Frontotemporal dementia: a randomised, controlled trial with trazodone. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;17(4):355-9. doi: 10.1159/000077171.

Lemoine L, Becker G, Vacher B, Billard T, Lancelot S, et al. Radiosynthesis and preclinical evaluation of 18F-F13714 as a fluorinated 5-HT1A receptor agonist radioligand for PET neuroimaging. *J Nucl Med*. 2012 Jun;53(6):969-76. doi: 10.2967/jnumed.111.101212.

Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, et al. [18F]F15599, a novel 5-HT1A receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Mar;37(3):594-605. doi: 10.1007/s00259-009-1274-y.

Lengyel-Zhand Z, Ferrie JJ, Janssen B, Hsieh CJ, Graham T, et al. Synthesis and characterization of high affinity fluorogenic α -synuclein probes. *Chem Commun (Camb)*. 2020 Mar 24;56(24):3567-3570. doi: 10.1039/c9cc09849f.

Lerond J, Lothe A, Ryvlin P, Bouvard S, d'Amato T, et al. Effects of aripiprazole, risperidone, and olanzapine on 5-HT1A receptors in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2013 Feb;33(1):84-9. doi: 10.1097/JCP.0b013e31827b97a6.

Levigoureux E, Lancelot S, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, et al. Binding of the PET radiotracer [¹⁸F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res*. 2014;11(10):955-60. doi: 10.2174/1567205011666141107154201.

Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, Lancelot S. PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Jan;25(1):57-68. doi: 10.1111/cns.12978.

Liu F, Majo VJ, Prabhakaran J, Milak MS, John Mann J, et al. Synthesis and in vivo evaluation of [O-methyl-11C] N-[3,5-dichloro-2-(methoxy)phenyl]-4-(methoxy)-3-(1-piperazinyl)benzenesulfonamide as an imaging probe for 5-HT₆ receptors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Sep 1;19(17):5255-9. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.090.

Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2009 Nov;89(3):277-87. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.08.001.

Lorke DE, Lu G, Cho E, Yew DT. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neurosci.* 2006 Apr 27;7:36. doi: 10.1186/1471-2202-7-36.

Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, et al. Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain.* 2008 Oct;131(Pt 10):2765-82. doi: 10.1093/brain/awn194.

Lothe A, Saoud M, Bouvard S, et al. 5-HT_{1A} receptor binding changes in patients with major depressive disorder before and after antidepressant treatment: A pilot [18F]MPPF positron emission tomography study. *Psychiatry Res Neuroimaging* (2012); 203: 103–104.

Louter MA, Wilbrink LA, Haan J, van Zwet EW, van Oosterhout WP, et al. Cluster headache and depression. *Neurology.* 2016 Nov 1;87(18):1899-1906. doi: 10.1212/WNL.0000000000003282.

Matsunaga S, Fujishiro H, Takechi H. Efficacy and safety of idalopirdine for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Int Psychogeriatr.* 2019 Nov;31(11):1627-1633. doi: 10.1017/S1041610218002156.

Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron.* 2013 Sep 18;79(6):1094-108. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.037.

Matharu MS, Zrinzo L. Deep Brain Stimulation in Cluster Headache: Hypothalamus or Midbrain Tegmentum? *Curr Pain Headache Rep* (2010); 14: 151–159.

Mathis CA, Huang Y, Simpson NR. Synthesis and evaluation of 5-HT_{1A} agonists a radioligands: failure of G protein-coupled receptor agonists as in vivo imaging agents. *J Label Compd Radiopharm* (1997); 563–564.

McCarron JA, Turton DR, Pike VW, et al. Remotely-controlled production of the 5-HT_{1A} receptor radioligand, [carbonyl-¹¹C]WAY-100635, via ¹¹C-carboxylation of an immobilized Grignard reagent. *J Label Compd Radiopharm* (1996); 38: 941–953.

Maurer A, Leonov A, Ryazanov S, Herfert K, Kuebler L, et al. ¹¹C Radiolabeling of anle253b: a Putative PET Tracer for Parkinson's Disease That Binds to α -Synuclein Fibrils in vitro and Crosses the Blood-Brain Barrier. *ChemMedChem*. 2020 Mar 5;15(5):411-415. doi: 10.1002/cmde.201900689.

May A, Bahra A, Büchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Hypothalamic activation in cluster headache attacks. *Lancet*. 1998 Jul 25;352(9124):275-8. doi: 10.1016/S0140-6736(98)02470-2.

May A, Bahra A, Büchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. PET and MRA findings in cluster headache and MRA in experimental pain. *Neurology*. 2000 Nov 14;55(9):1328-35. doi: 10.1212/wnl.55.9.1328.

May A, Ashburner J, Büchel C, McGonigle DJ, Friston KJ, et al. Correlation between structural and functional changes in brain in an idiopathic headache syndrome. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):836-8. doi: 10.1038/10561.

Melhem NM, Zhong Y, Miller JM, Zanderigo F, Ogden RT, et al. Brain 5-HT_{1A} Receptor PET Binding, Cortisol Responses to Stress, and the Familial Transmission of Suicidal Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2022 Jan 12;25(1):36-45. doi: 10.1093/ijnp/pyab060.

Meneses A. Memory formation and memory alterations: 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors, novel alternative *Rev Neurosci*. 2014;25(3):325-56. doi: 10.1515/revneuro-2014-0001.

Mico JA, Berrocoso E, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Rojas-Corrales MO. The role of 5-HT_{1A} receptors in research strategy for extensive pain treatment. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(18):1997-2003. doi: 10.2174/156802606778522195.

Milak MS, DeLorenzo C, Zanderigo F, Prabhakaran J, Kumar JS, et al. In vivo quantification of human serotonin 1A receptor using ¹¹C-CUMI-101, an agonist PET radiotracer. *J Nucl Med*. 2010 Dec;51(12):1892-900. doi: 10.2967/jnumed.110.076257.

Milak MS, Severance AJ, Ogden RT, Prabhakaran J, Kumar JS, et al. Modeling considerations for ¹¹C-CUMI-101, an agonist radiotracer for imaging serotonin 1A receptor in vivo with PET. *J Nucl Med*. 2008 Apr;49(4):587-96. doi: 10.2967/jnumed.107.046540.

Milak MS, Severance AJ, Prabhakaran J, Kumar JS, Majo VJ, et al. In vivo serotonin-sensitive binding of [¹¹C]CUMI-101: a serotonin 1A receptor agonist positron emission tomography radiotracer. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Jan;31(1):243-9. doi: 10.1038/jcbfm.2010.83.

Miranda-Azpiazu P, Svedberg M, Higuchi M, Ono M, Jia Z, et al. Identification and in vitro characterization of C05-01, a PBB3 derivative with improved affinity for alpha-synuclein. *Brain Res.* 2020 Dec 15;1749:147131. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147131.

Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci* (2020); 21: 8870.

Mongeau R, Welner SA, Quirion R, Suranyi-Cadotte BE. Further evidence for differential affinity states of the serotonin1A receptor in rat hippocampus. *Brain Res.* 1992 Sep 11;590(1-2):229-38. doi: 10.1016/0006-8993(92)91100-s

Morelli N, Pesaresi I, Cafforio G, Maluccio MR, Gori S, et al. Functional magnetic resonance imaging in episodic cluster headache. *J Headache Pain.* 2009 Feb;10(1):11-4. doi: 10.1007/s10194-008-0085-z.

Motulsky HJ and Neubig RR. « Analyzing Binding Data ». en. In : *Current Protocols in Neuroscience.* JohnWiley & Sons, Inc., 2001 (cf. p. 30).

Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging.* 2012 Sep;33(9):2225-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022.

Müller CP, Carey RJ, Huston JP, De Souza Silva MA. Serotonin and psychostimulant addiction: focus on 5-HT1A-receptors. *Prog Neurobiol.* 2007 Feb;81(3):133-78. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.01.001.

Naegel S, Holle D, Obermann M. Structural Imaging in Cluster Headache. *Curr Pain Headache Rep* (2014); 18: 415.

Neal KL, Shakerdige NB, Hou SS, Klunk WE, Mathis CA, et al. Development and screening of contrast agents for in vivo imaging of Parkinson's disease. *Mol Imaging Biol.* 2013 Oct;15(5):585-95. doi: 10.1007/s11307-013-0634-y.

Nesbitt AD, Goadsby PJ. Cluster headache. *BMJ* (2012); 344: e2407–e2407.

Newman-Tancredi A, Bardin L, Auclair A, Colpaert F, Depoortère R, Varney MA. NLX-112, a highly selective 5-HT1A receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT1A receptors, respectively. *Brain Res.* 2018 Jun 1;1688:1-7. doi: 10.1016/j.brainres.

Newman-Tancredi A, Depoortère RY, Kleven MS, Kołaczkowski M, Zimmer L. Translating biased agonists from molecules to medications: Serotonin 5-HT1A receptor functional selectivity for CNS disorders. *Pharmacol Ther.* 2022 Jan;229:107937. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107937

Nirogi R, Abraham R, Benade V, Medapati RB, Jayarajan P, et al. SUVN-502, a novel, potent, pure, and orally active 5-HT6 receptor antagonist: pharmacological, behavioral,

and neurochemical characterization. *Behav Pharmacol.* 2019 Feb;30(1):16-35. doi: 10.1097/FBP.0000000000000414.

Nirogi R, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana NR, Goyal VK, et al. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of the Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonist, SUVN-502, in Healthy Young Adults and Elderly Subjects. *Clin Drug Investig.* 2018 May;38(5):401-415. doi: 10.1007/s40261-018-0618-4.

Pantazatos SP, Melhem NM, Brent DA, Zanderigo F, Bartlett EA, et al. Ventral prefrontal serotonin 1A receptor binding: a neural marker of vulnerability for mood disorder and suicidal behavior? *Mol Psychiatry.* 2022 Oct;27(10):4136-4143. doi: 10.1038/s41380-022-01671-y.

Parker CA, Gunn RN, Rabiner EA, Slifstein M, Comley R, et al. Radiosynthesis and characterization of ¹¹C-GSK215083 as a PET radioligand for the 5-HT₆ receptor. *J Nucl Med.* 2012 Feb;53(2):295-303. doi: 10.2967/jnumed.111.093419.

Passchier J, van Waarde A, Pieterman RM, Elsinga PH, Pruijm J, et al. In vivo delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with [¹⁸F]MPPF. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* (2000); 41: 1830–1835.

Pike VW, McCarron JA, Lammerstma AA, Hume SP, Poole K, et al. First delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [¹¹C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 1995 Sep 5;283(1-3):R1-3. doi: 10.1016/0014-2999(95)00438-q.

Pinborg LH, Feng L, Haahr ME, Gillings N, Dyssegaard A, et al. No change in [¹¹C]CUMI-101 binding to 5-HT(1A) receptors after intravenous citalopram in human. *Synapse.* 2012 Oct;66(10):880-4. doi: 10.1002/syn.21579.

Prange S, Theis H, Banwinkler M, van Eimeren T. Molecular Imaging in Parkinsonian Disorders-What's New and Hot? *Brain Sci.* 2022 Aug 27;12(9):1146. doi: 10.3390/brainsci12091146.

Procter AW, Qurne M, Francis PT. Neurochemical features of frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10:80–4. doi: 10.1159/000051219.

Qiu E, Tian L, Wang Y, Ma L, Yu S. Abnormal coactivation of the hypothalamus and salience network in patients with cluster headache. *Neurology.* 2015 Apr 7;84(14):1402-8. doi: 10.1212/WNL.0000000000001442.

Qiu E, Wang Y, Ma L, Tian L, Liu R, et al. Abnormal brain functional connectivity of the hypothalamus in cluster headaches. *PLoS One.* 2013;8(2):e57896. doi: 10.1371/journal.pone.0057896.

Rabiner EA, Messa C, Sargent PA, Husted-Kjaer K, Montgomery A, et al. A database of [¹¹C]WAY-100635 binding to 5-HT(1A) receptors in normal male volunteers: normative

data and relationship to methodological, demographic, physiological, and behavioral variables. *Neuroimage*. 2002 Mar;15(3):620-32. doi: 10.1006/ning.2001.0984.

Ramirez MJ, Lai MK, Tordera RM, Francis PT. Serotonergic therapies for cognitive symptoms in Alzheimer's disease: rationale and current status. *Drugs*. 2014 May;74(7):729-36. doi: 10.1007/s40265-014-0217-5.

Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2456-77. doi: 10.1093/brain/awr179.

Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol*. 2014 Mar;75(3):351-62. doi: 10.1002/ana.24066.

Rigney G, Ayubcha C, Werner TJ, Alavi A. An Update on the State of Tau Radiotracer Development: a Brief Review. *Mol Imaging Biol*. 2021 Dec;23(6):797-808. doi: 10.1007/s11307-021-01612-1.

Robbins MS, Starling AJ, Pringsheim TM, Becker WJ, Schwedt TJ. Treatment of Cluster Headache: The American Headache Society Evidence-Based Guidelines. *Headache*. 2016 Jul;56(7):1093-106. doi: 10.1111/head.12866.

Rocca MA, Valsasina P, Absinta M, Colombo B, Barcella V, et al. Central nervous system dysregulation extends beyond the pain-matrix network in cluster headache. *Cephalalgia*. 2010 Nov;30(11):1383-91. doi: 10.1177/0333102410365164.

Sanabria-Bohórquez SM, Biver F, Damhaut P, Wikler D, Veraart C, Goldman S. Quantification of 5-HT(1A) receptors in human brain using p-MPPF kinetic modelling and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002 Jan;29(1):76-81. doi: 10.1007/s00259-001-0684-2

Schneck N, Tu T, Falcone HR, Miller JM, Zanderigo F, et al. Large-scale network dynamics in neural response to emotionally negative stimuli linked to serotonin 1A binding in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2021 Jun;26(6):2393-2401. doi: 10.1038/s41380-020-0733-5.

Schweighauser M, Shi Y, Tarutani A, Kametani F, Murzin AG, et al. Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature*. 2020 Sep;585(7825):464-469. doi: 10.1038/s41586-020-2317-6.

Seifert CL, Magon S, Staehle K, Zimmer C, Foerschler A, Radue EW, Pfaffenrath V, Tölle TR, Sprenger T. A case-control study on cortical thickness in episodic cluster headache. *Headache*. 2012 Oct;52(9):1362-8. doi: 10.1111/j.1526-4610.2012.02217.x.

Selvaraj S, Turkheimer F, Rosso L, Faulkner P, Mouchlianitis E, et al. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission in humans: a [¹¹C]CUMI-101 PET challenge study. *Mol Psychiatry*. 2012 Dec;17(12):1254-60. doi: 10.1038/mp.2012.78.

Selvaraj S, Mouchlianitis E, Faulkner P, Turkheimer F, Cowen PJ, et al. Presynaptic Serotonergic Regulation of Emotional Processing: A Multimodal Brain Imaging Study. *Biol Psychiatry*. 2015 Oct 15;78(8):563-571. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.04.011.

Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016 Sep 1;537(7618):50-6. doi: 10.1038/nature19323.

Sgambato-Faure V, Billard T, Météreau E, Duperrier S, Fieux S, et al. Characterization and Reliability of [¹⁸F]2FNQ1P in Cynomolgus Monkeys as a PET Radiotracer for Serotonin 5-HT₆ Receptors. *Front Pharmacol*. 2017 Jul 18;8:471. doi: 10.3389/fphar.2017.00471.

Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci*. 2019 Jul;22(7):1099-1109. doi: 10.1038/s41593-019-0423-2.

Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, et al. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol*. 2017 Feb 1;74(2):163-172. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4547.

Shrestha SS, Liow JS, Lu S, Jenko K, Gladding RL, et al. (11)C-CUMI-101, a PET radioligand, behaves as a serotonin 1A receptor antagonist and also binds to α (1) adrenoceptors in brain. *J Nucl Med*. 2014 Jan;55(1):141-6. doi: 10.2967/jnumed.113.125831.

Shiue CY, Shiue GG, Mozley PD, Kung MP, Zhuang ZP, et al. P-[¹⁸F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT_{1A} receptors in humans. *Synapse*. 1997 Feb;25(2):147-54. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199702)25:2<147::AID-SYN5>3.0.CO;2-C.

Sparks DL, Markesbery WR. Altered serotonergic and cholinergic synaptic markers in Pick's disease. *Arch Neurol* 1991; 48:796-9.

Sprenger T, Boecker H, Tolle TR, Bussone G, May A, Leone M. Specific hypothalamic activation during a spontaneous cluster headache attack. *Neurology*. 2004 Feb 10;62(3):516-7. doi: 10.1212/wnl.62.3.516.

Sprenger T, Ruether KV, Boecker H, Valet M, Berthele A, et al. Altered metabolism in frontal brain circuits in cluster headache. *Cephalalgia*. 2007 Sep;27(9):1033-42. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01386.x.

Sprenger T, Willoch F, Miederer M, Schindler F, Valet M, et al. Opioidergic changes in the pineal gland and hypothalamus in cluster headache: a ligand PET study. *Neurology*. 2006 Apr 11;66(7):1108-10. doi: 10.1212/01.wnl.0000204225.15947.f8.

Sullivan GM, Ogden RT, Huang YY, Oquendo MA, Mann JJ, Parsey RV. Higher in vivo serotonin-1a binding in posttraumatic stress disorder: a PET study with [11C]WAY-100635. *Depress Anxiety*. 2013 Mar;30(3):197-206. doi: 10.1002/da.22019.

Tang S, Verdurand M, Joseph B, Lemoine L, Daoust A, et al. Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [18F]12ST05 as a potential 5-HT6 PET radioligand. *Nucl Med Biol*. 2007 Nov;34(8):995-1002. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.07.002.

Tauscher J, Kapur S, Verhoeff NP, Hussey DF, Daskalakis ZJ, et al. Brain serotonin 5-HT(1A) receptor binding in schizophrenia measured by positron emission tomography and [11C]WAY-100635. *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Jun;59(6):514-20. doi: 10.1001/archpsyc.59.6.514.

de la Torre JC, Gonzalez-Lima F. The FDA Approves Aducanumab for Alzheimer's Disease, Raising Important Scientific Questions1. *J Alzheimers Dis*. 2021;82(3):881-882. doi: 10.3233/JAD-210736.

Trojanowski JQ. "Emerging Alzheimer's disease therapies: focusing on the future". *Neurobiol Aging*. 2002 Nov-Dec;23(6):985-90. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00123-9.

Vanda D, Soural M, Canale V, Chaumont-Dubel S, Satała G, et al. Novel non-sulfonamide 5-HT6 receptor partial inverse agonist in a group of imidazo[4,5-b]pyridines with cognition enhancing properties. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 20;144:716-729. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.053.

van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023 Jan 5;388(1):9-21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948.

Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Berthier L, Mendjel-Herda M, et al. In Silico, in Vitro, and in Vivo Evaluation of New Candidates for α -Synuclein PET Imaging. *Mol Pharm*. 2018a Aug 6;15(8):3153-3166. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00229.

Verdurand M, Levigoureux E, Lancelot S, Zeinyeh W, Billard T, et al. Amyloid-Beta Radiotracer [18F]BF-227 Does Not Bind to Cytoplasmic Glial Inclusions of Postmortem Multiple System Atrophy Brain Tissue. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018b Feb 6;2018:9165458. doi: 10.1155/2018/9165458.

Vernon AC, Ballard C, Modo M. Neuroimaging for Lewy body disease: is the in vivo molecular imaging of α -synuclein neuropathology required and feasible? *Brain Res Rev*. 2010 Oct 5;65(1):28-55. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.006.

Vidal B, Fieux S, Colom M, Billard T, Bouillot C, et al. 18F-F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. *Brain Struct Funct*. 2018 Jul;223(6):2973-2988. doi: 10.1007/s00429-018-1672-7.

Vidal B, Levigoureux E, Chaib S, Bouillot C, Billard T, et al. Different Alterations of Agonist and Antagonist Binding to 5-HT1A Receptor in a Rat Model of Parkinson's Disease and Levodopa-Induced Dyskinesia: A MicroPET Study. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(3):1257-1269. doi: 10.3233/JPD-212580.

Vidal B, Sebti J, Verdurand M, Fieux S, Billard T, Streichenberger N, Troakes C, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT1A receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology*. 2016 Oct;109:88-95. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.009.

Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol*. 2015 Jan;14(1):114-24. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70252-2.

Visanji NP, Lang AE, Kovacs GG. Beyond the synucleinopathies: alpha synuclein as a driving force in neurodegenerative comorbidities. *Transl Neurodegener*. 2019 Sep 4;8:28. doi: 10.1186/s40035-019-0172-x.

Waldenlind E, Ross SB, Säaf J, Ekblom K, Wetterberg L. Concentration and uptake of 5-hydroxytryptamine in platelets from cluster headache and migraine patients. *Cephalalgia*. 1985 Mar;5(1):45-54. doi: 10.1046/j.1468-2982.1985.0501045.x.

Wan OW, Shin E, Mattsson B, Caudal D, Svenningsson P, Björklund A. α -Synuclein induced toxicity in brain stem serotonin neurons mediated by an AAV vector driven by the tryptophan hydroxylase promoter. *Sci Rep*. 2016 May 23;6:26285. doi: 10.1038/srep26285.

Wang R, Pang SC, Li JY, Li CL, Liu JM, et al. A review of the current research on in vivo and in vitro detection for alpha-synuclein: a biomarker of Parkinson's disease. *Anal Bioanal Chem*. 2023 Apr;415(9):1589-1605. doi: 10.1007/s00216-023-04520-1

Watson J, Collin L, Ho M, Riley G, Scott C, et al. 5-HT(1A) receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br J Pharmacol*. 2000 Jul;130(5):1108-14. doi: 10.1038/sj.bjp.0703394.

Wesołowska A, Rychtyk J, Gdula-Argasińska J, Górecka K, Wilczyńska-Zawal N, et al. Effect of 5-HT6 Receptor Ligands Combined with Haloperidol or Risperidone on Antidepressant-/Anxiolytic-Like Behavior and BDNF Regulation in Hippocampus and Prefrontal Cortex of Rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2021 Jun 25;17:2105-2127. doi: 10.2147/NDT.S309818. eCollection 2021.

Wicke K, Haupt A, Bespalov A. Investigational drugs targeting 5-HT₆ receptors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(12):1515-28. doi: 10.1517/13543784.2015.1102884.

Wilkinson D, Windfeld K, Colding-Jørgensen E. Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2014 Nov;13(11):1092-1099. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70198-X.

Yang FC, Chou KH, Fuh JL, Lee PL, Lirng JF, et al. Altered hypothalamic functional connectivity in cluster headache: a longitudinal resting-state functional MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Apr;86(4):437-45. doi: 10.1136/jnnp-2014-308122.

Yang FC, Chou KH, Fuh JL, Huang CC, Lirng JF, et al. Altered gray matter volume in the frontal pain modulation network in patients with cluster headache. *Pain*. 2013 Jun;154(6):801-7. doi: 10.1016/j.pain.2013.02.005.

Yokoyama C, Mawatari A, Kawasaki A, Takeda C, Onoe K, et al. Marmoset Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Mapping with a Biased Agonist PET Probe 18F-F13714: Comparison with an Antagonist Tracer 18F-MPPF in Awake and Anesthetized States. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016 Dec 30;19(12):pyw079. doi: 10.1093/ijnp/pyw079.

You IJ, Wright SR, Garcia-Garcia AL, Tapper AR, Gardner PD, et al. 5-HT_{1A} Autoreceptors in the Dorsal Raphe Nucleus Convey Vulnerability to Compulsive Cocaine Seeking. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Apr;41(5):1210-22. doi: 10.1038/npp.2015.268.

Zajdel P, Grychowska K, Mogilski S, Kurczab R, Satała G, et al. Structure-Based Design and Optimization of FPPQ, a Dual-Acting 5-HT₃ and 5-HT₆ Receptor Antagonist with Antipsychotic and Procognitive Properties. *J Med Chem*. 2021 Sep 23;64(18):13279-13298. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00224.

Zhang X, Jin H, Padakanti PK, Li J, Yang H, et al. Radiosynthesis and in Vivo Evaluation of Two PET Radioligands for Imaging α -Synuclein. *Appl Sci (Basel)*. 2014 Mar 17;4(1):66-78. doi: 10.3390/app4010066.

Zhuang Z-P, Kung M-P, Kung HF. Synthesis And Evaluation of 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2''-pyridinyl)- p-iodobenzamido]ethyl]piperazine (p-MPPI): A New Iodinated 5-HT_{1A} Ligand. *J Med Chem* (1994); 37: 1406-1407.

PARTIE III : PUBLICATIONS REPRESENTATIVES

Annexe 1 : sélection d'article n°1 (en page 40)

Levigoureux E, Lancelot S, Bouillot C, Chauveau F, Verdurand M, Verchere J, Billard T, Baron T, Zimmer L. Binding of the PET radiotracer [¹⁸F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(10):955-60. doi: 10.2174/1567205011666141107154201.

Ce travail correspond à la première étude d'imagerie microTEP chez le modèle de souris transgénique TgM83 sur-exprimant la protéine α -Syn humaine sous forme mutée en collaboration avec l'ANSES à Lyon (Dr Thierry Baron).

Binding of the PET Radiotracer [¹⁸F]BF227 Does not Reflect the Presence of Alpha-Synuclein Aggregates in Transgenic Mice

Elise Levigoureux^{1,2}, Sophie Lancelot^{1,2}, Caroline Bouillot³, Fabien Chauveau¹, Mathieu Verdurand¹, Jeremy Verchere⁴, Thierry Billard⁵, Thierry Baron⁴ and Luc Zimmer^{1,2,3,*}

¹Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM, CNRS, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France; ²Hospices Civils de Lyon, France; ³CERMEP – Imagerie du Vivant, Lyon, France; ⁴ANSES, Neurodegenerative Disease's Unit, Lyon, France; ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institute of Chemistry and Biochemistry, Lyon, France

Abstract: Alpha-synuclein (α -syn) aggregation is a neuropathological hallmark of many neurodegenerative diseases, collectively termed synucleinopathies. There is currently no *pre-mortem* diagnosis tool for these diseases. Although some compounds have been described as potential ligands for α -syn aggregates, no specific PET radiotracer of aggregated α -syn is currently available. Recently, [¹⁸F]BF227 has been proposed as an α -syn PET radiotracer in the absence of other specific candidates. We proposed here, for the first time, to use this radiotracer in an accelerated mouse model of synucleinopathy presenting α -syn depositions in brainstem and thalamus. Our *in vivo* and *in vitro* studies showed that [¹⁸F]BF227 does not bind to α -syn aggregates. These results highlight the fact that [¹⁸F]BF227 PET has no suitable characteristics for monitoring this experimental synucleinopathy, justifying the need to develop alternative α -syn PET radiotracers.

Keywords: Alpha-synuclein, brain, neuroimaging, small animal PET, synucleinopathies.

INTRODUCTION

Alpha-synuclein (α -syn) aggregation is a neuropathological hallmark of many neurodegenerative diseases including Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA), collectively termed synucleinopathies [1-3]. There is currently no definitive *pre-mortem* diagnosis tool for these progressive neurodegenerative disorders. To date, the definitive confirmation of synucleinopathies is only possible upon *post-mortem* histopathological studies, using antibodies and dyes that stain insoluble protein aggregates [4]. The availability of an imaging agent that reflects the amount and distribution of α -syn aggregates in the brain would be advantageous, particularly because such an agent could be used for the specific diagnosis of synucleinopathies in pre-symptomatic stages of disease. Following this aim, positron emission tomography (PET) is a nuclear medicine imaging modality allowing the study of brain neurochemistry with unequalled sensitivity. Radiopharmaceutical developments have enabled performing non-disrupted *in vivo* observations both in animal models [5] and more interestingly in humans [6, 7]. Thus, small molecules that interact directly with aggregated α -syn at subfemtomolar concentrations could constitute the basis of a contrast agent designed to assess the α -syn-positive Lewy body load in synucleinopathies through *in vivo* neuroimaging [4], facilitating a *pre-mortem* diagnosis. Although some compounds have been described as potential ligands for α -syn aggregates, to date, no specific PET radiotracer of aggregated α -syn is available. In particular, radiolabelled

BF227 is a radioligand that was initially proposed for the diagnosis of Alzheimer disease thanks to its high affinity for amyloid plaques [8]. In 2009, an *in vitro* study reported the presence of high affinity binding sites towards α -syn fibrils for [¹⁸F]BF227 [9]. In 2010, Kikuchi *et al.* published a study revealing a binding of [¹¹C]BF227 to α -syn-containing glial inclusions in human *post-mortem* brain [10]. *In vivo* PET scans were performed in MSA patients and authors concluded that [¹¹C]BF227 binding could distinguish MSA from other degenerative diseases [10]. However, at this stage, experimental justifications showing a specific binding of [¹¹C]BF227 on α -syn inclusions are lacking. The aim of this study was therefore to evaluate the binding ability of [¹⁸F]BF227, the fluorinated equivalent of [¹¹C]BF227, both strictly identical in terms of chemical structure and pharmacology, in an original mouse model of synucleinopathy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study was performed with transgenic mouse model (TgM83) expressing the human A53T mutated α -syn [11]. Homozygous TgM83 mice (7-9 weeks old) were intracerebrally inoculated with 20 μ L of 1% (wt/vol in glucose 5%) homogenates obtained from half of the brain of TgM83 mice euthanized following the development of clinical signs due to α -syn pathology at the first passage (ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Lyon). In this accelerated model of TgM83 mice, α -syn aggregates appeared ~100 days after inoculation, especially in the brainstem and in the midbrain [12]. This period corresponded to the time of biochemical and PET experiments. Control animals were C57Bl/6S mice, presenting a

*Address correspondence to this author at the CERMEP-Imaging Platform, 59 boulevard Pinel, Lyon, F-69003, France; Tel: (+33)472688609; Fax: (+33)472688610; E-mail: zimmer@univ-lyon1.fr

deletion of the α -syn locus (α -syn K.O.) (Harlan, Gannat, France). All experiments were realized in accordance with the European guidelines for care of laboratory animals (2010/63/EU) and were approved by the ethics committee of the University of Lyon.

Thioflavin-S Analysis

After euthanasia, mouse brains were carefully removed and immediately frozen in dry-ice. Briefly, coronal sections (30 μ m thick) cut across the brainstem, cerebellum, thalamus and hippocampus were carried out using a -20°C cryostat (Leica), thaw-mounted on SuperFrost® glass slides and allowed to air-dry before storage at -80°C until use. Brain sections were stained with thioflavin-S (Sigma Aldrich). Staining was performed using sections post-fixed in 4% paraformaldehyde. Sections were incubated in Thioflavin S 0.05% followed by NaOH plus H_2O treatment. The induced fluorescence was observed using an imaging microscope (Axioptan-2, Zeiss; Oberkochen, Germany). The filter used was FITC (ex 470 ± 20 nm, em >515 nm). Images were captured using a digital camera interfaced with an image-analysis computer (Axiovision 3.0 software, Zeiss).

Alpha-Synuclein Detection by Western Blot

Brain tissue was collected as previously described. After heat denaturation (5 min at 100°C), proteins were separated by electrophoresis using 12% SDS polyacrylamide gels before being electro-blotted onto polyvinylidene fluoride membranes (BioRad, Marnes La Coquette, France). α -syn was probed with either mouse monoclonal antibody (mAb) clone 42 against α -syn (1:2000) (BD Biosciences, ref 610787), rabbit mAb against pSer129 α -syn (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK, ref ab51253). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (Ig) secondary antibodies (1:1000). The immunocomplexes were visualized with chemiluminescent reagents (Supersignal WestDura, Thermo, ref 34076), followed by exposure on Biomax MR Kodak films, or CL-Exposure films, and by analysis using dedicated softwares (Versa Doc system and Quantity One software, both from BioRad).

Alpha-Synuclein Detection by ELISA

Levels of disease-associated α -syn in brain extracts were measured using a sandwich ELISA Plates (MaxiSorp TM, Thermo Scientific Nunc), coated with capture antibodies, either 0.01 ng/mL anti α -syn rabbit polyclonal against pSer129 α -syn, (Millipore, ref AB5038P) or monoclonal clone 42 antibody against human α -syn (BD Biosciences) [13]. For data analysis, the optical density (OD) value obtained in the well with all the reagents except the sample (Blank well) was subtracted from the OD value of each analyzed sample.

Radiosynthesis of [^{18}F]BF227 and Quality Control

The PET radioisotope fluorine-18 was obtained via the $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ reaction (IBA Cyclone18/9 cyclotron). The fluoro substitution of tosylate was realized on a standard Neptis® synthesizer (ORA™): after initial fluoride prepara-

tion (collection, drying and Kryofix activation), 1.4-2.5 mg of BOTs227 radiolabelling precursor were introduced and the reaction mixture was heated at 150°C for 10 min in DMSO. After dilution with 15 mL of water, the reaction mixture was passed through an activated C18 cartridge for pre-purification and the crude product was eluted from the cartridge with 1.5 mL of methanol. Pure [^{18}F]BF227 was obtained after separation on a preparative high-performance liquid HPLC (C18 Symmetry Prep Waters 7 μ m 7.8 \times 300 mm, Waters) eluted with H_3PO_4 20mM/THF/TFA 80/20/0.1% at 3 mL.min $^{-1}$ ($\lambda=254$ nm), with a retention time of 43 min. For biological use, the product was formulated via SPE techniques [14]. The dilution of the product was done with 20 mL of sterile water, loaded onto a C18 cartridge (SEP-Pak Light, Waters). The loaded cartridge was rinsed with water, eluted with 1 mL of ethanol and diluted with isotonic saline to an ethanol concentration of 5%. Quality control consisted in determination of radiochemical purity and specific activity, by analytical HPLC assay (UV and radioactive detections; Macherey Nagel EC 250/4.6 Nucleodur 100-5-C18ec C18 column; elution with H_3PO_4 20 mM/THF 65/35 at 0.9 mL.min $^{-1}$; with a retention time of 13.5 min). The identity of [^{18}F]BF227 was confirmed by co-injection with an authentic non-radioactive sample.

Autoradiographic Assay

Autoradiographic assay and thioflavin-S analysis were performed using the same brain sections. The day of radiotracer synthesis, brain sections, whose preparation is described previously (see *Thioflavin-S Analysis*), were allowed to reach ambient temperature and were then incubated for 30 min in Phosphate-Buffered-Saline buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH adjusted to 7.4) containing 37 kBq/mL of [^{18}F]BF227. For competition experiments, the slides were placed in the same buffer supplemented with non-radiolabelled BF227 at 10 μ M. After incubation, the slides were dipped twice in mixture buffer/ethanol 1:1 at room temperature for 60 s, in cold distilled water (4°C) for 10 s, then dried and juxtaposed to a phosphor imaging plate for 30 min (BAS-5000, Fujifilm). Regions of interest (brainstem, cerebellum, thalamus and hippocampus) were manually drawn using Multigauge software (Fujifilm). Results were expressed in PSL/mm 2 (photostimulated luminescence per surface unit) and uptake for each region of interest was expressed as a ratio using the hippocampus as reference tissue because it was described as devoid of α -syn aggregates [11].

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI was performed on a 7T Bruker Biospec system (Bruker Biospin GbmH, Germany) coupled to Bruker BGA12 (450 mT/m) gradients A 72 mm diameter Bruker volume coil was used for signal emission and a 15-mm diameter surface coil for signal detection to provide the best coverage around the mouse brain. Axial anatomical T2-weighted RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) images were obtained with the following parameters: effective echo time = 60.28 ms, repetition time = 7500 ms, in-plane resolution 78 \times 78 μm^2 and 47 slices of 330 μm thickness, RARE factor = 8, acquisition time = 24 min.

Positron Emission Tomography (PET)

TgM83 (n=9) and α -syn knock-out (K.O.) mice (n=7) were evaluated at 4-5 months of age. Animals were anesthetized using isoflurane (4% induction and 2% maintenance). Breathing rate was monitored throughout the experiment. After catheterization of a caudal vein, the mouse head was centered in the field of view (FOV) of the camera. PET scans were acquired in list mode, using a Siemens INVEON PET/CT scanner, with a nominal in-plane resolution of ~ 1.4 mm full-width-at-half-maximum in the center of the FOV. A 60-minutes list mode acquisition started immediately, after caudal intra-venous (i.v.) injection of [18 F]BF227 (6.47 ± 2.7 MBq; min 3.2-max 12.02 MBq). Images were reconstructed with attenuation and scatter correction by a 3D-filtered back-projection algorithm (Hamming filter; cut-off frequency 0.5 cycles/pixel) and a zoom factor of two. This led to a reconstructed volume of 159 slices of 128×128 voxels, in a bounding box of $49.7 \times 49.7 \times 126$ mm, with voxel size $0.388 \times 0.388 \times 0.796$ mm. The dynamic images obtained were analyzed with the INVEON research Workplace (IRW, Siemens).

Data Analysis and Statistics

The T2 MRI was manually segmented into 9 volumes of interest VOIs (whole brain, right thalamus, left thalamus, right hippocampus, left hippocampus, brainstem, right cerebellum, left cerebellum, cerebellar white matter), according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson [15].

Registration and normalization between PET and MRI were computed. PET measures were extracted using the res-

liced MRI in the PET space. PET data were extracted using MRI-based VOIs and were expressed in SUVs (Standard Uptake Values). Target-to-reference tissue standardized uptake value ratios (SUVRs) were also calculated using the total hippocampus as the reference region in the same way as autoradiographic study.

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism program (version 5.04; GraphPad Software). Differences between groups of transgenic mice and α -syn KO mice were tested using Mann and Whitney tests. Differences were considered statistically significant if the *P* value was less than 0.05.

RESULTS

Thioflavin S Analysis

Thioflavin S staining performed in brain sections showed presence of β -sheet structures in the brainstem and the thalamus in TgM83 mice. No fluorescent signal was observed in the cerebellum and the hippocampus (Fig. 1A). Fluorescence was negative in α -syn KO brain sections for all regions tested.

Alpha-Synuclein Detection by Western Blot

Western blot studies performed in brain tissue revealed insoluble pSer129 α -syn in TgM83 mice. The accumulation of α -syn was not detected in α -syn KO mice (Fig. 1B).

Alpha-Synuclein Detection by ELISA

ELISA analysis of the immunoreactivities in whole brain homogenates clearly distinguished TgM83 mice from α -syn

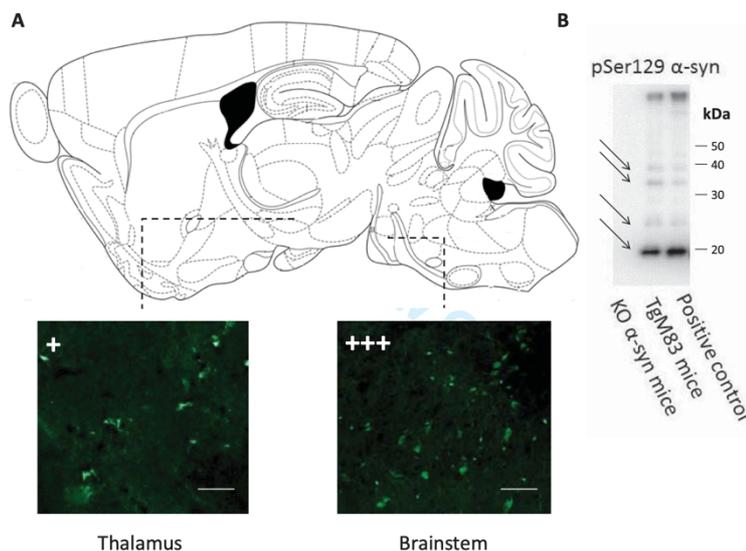


Fig. (1). Characterization of the mouse model of synucleinopathy. (A) Thioflavine S staining on a sagittal brain section of TgM83 mice (according to the atlas of Paxinos [1]). β -sheet structures are revealed in majority in the brainstem and, to a lesser extent, in the thalamus. No staining is visible in hippocampus or cerebellum (data not shown). (B) Western blot detection of α -syn using antibody pSer129 α -syn (B) in insoluble fraction after biochemical extraction of the half of brain homogenates 20% (m/v) of TgM83 and α -syn KO mice. The positions of molecular mass markers are depicted on the left. The Western blot shows the accumulation of insoluble and aggregated α -syn in TgM83 mice and their total absence in α -syn KO mice (arrows). The positive control is constituted of symptomatic TgM83 brain tissue.

KO mice. Values of OD were 0.174 and 0.218 (for LB509 and PS129 respectively) in TgM83 mice versus 0.006 and 0.014 in α -syn KO mice, confirming the presence of α -syn in TgM83 mice brain.

Radiosynthesis of [18 F]BF227 and Quality Control

The synthetic route for the preparation of [18 F]BF227 is shown in Fig. (2). Radiochemical purity was better than 95 % and specific activity was between 40.7 and 107.3 GBq. μ mol $^{-1}$ corrected at EOS (End Of Synthesis).

Autoradiography Assay

The distribution of [18 F]BF227 was evaluated by semi-quantitative autoradiography on brain sections. Autoradiograms showed comparable binding in the brain of transgenic and control mice (Fig. 3). For all regions tested (brainstem, cerebellum and thalamus), no significant differences were observed ($p=0.886$; $p=0.200$ and $p=0.343$ respectively). Competitive studies with unlabeled BF227 did not show decrease in [18 F]BF227 uptake suggesting there was no specific binding (data not shown).

In vivo Studies

[18 F]BF227 images showed no significant differences between uptake in region of interest in TgM83 and α -syn KO mice (Fig. 4). The two groups of mice showed rapid [18 F]BF227 brain entry and clearance (Fig. 4C). The highest peaks were 7.57 ± 2.01 % ID/g (Injected Dose per g of mouse) in transgenic mice and 6.81 ± 3.19 % ID/g in α -syn

KO mice at 1.83 min. Binding ratio (expressed in SUVR) were obtained with times curves integrated from 40 to 60 min. The average binding ratios [brainstem/hippocampus], [cerebellum/hippocampus] and [thalamus/hippocampus] were 1.18, 0.97 and 1.13 in TgM83 mice versus 1.19, 1.02, and 1.13 in α -syn KO mice. No significant differences were observed between the two groups of mice in any region: brainstem, cerebellum and thalamus ($p=0.84$, $p=0.07$, and $p=0.41$).

DISCUSSION

Several transgenic mouse models expressing wild-type (WT) or mutant (A53T or A30P) α -syn have been developed using a variety of promoters to regulate transgene expression. Among these, *in vivo* model systems are available for pre-clinical evaluation of α -syn imaging agents [16]. We recently developed a model of prion-like acceleration of synucleinopathy [13]. We used a transgenic mouse model (TgM83) expressing the human A53T mutated α -synuclein intracerebrally inoculated with brain homogenates from old TgM83 mice showing motor clinical signs. This triggered an early onset of characteristic motor clinical signs compared with non-inoculated TgM83 mice.

In the first part of this study, we confirmed the validity of this accelerated model of TgM83 mouse, showing the presence of α -syn aggregates. Our thioflavin S assay and biochemical analyses by Western-Blots demonstrated the presence of typical α -syn deposition with β -sheet structures, in accordance with our recent articles [12, 13]. Pathological lesions were abundant in the brainstem and in the

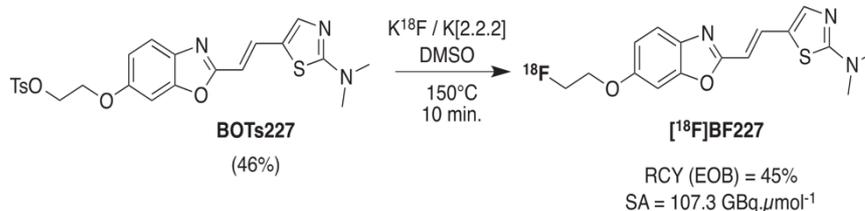


Fig. (2). Diagram of the radiosynthesis of [18 F]BF227. The tosylate precursor (BOTs227) is radiolabelled in DMSO at 150°C for 10 min leading to [18 F]BF227.

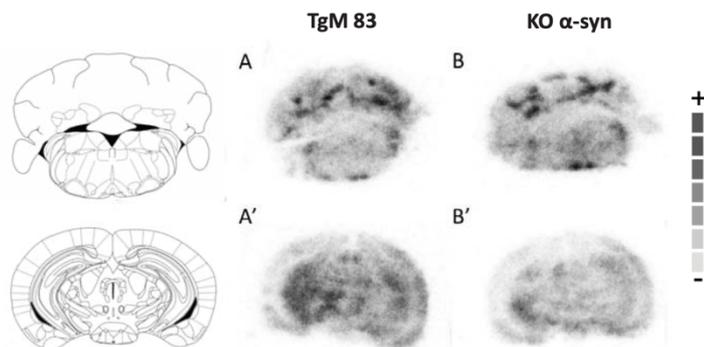


Fig. (3). *In vitro* autoradiograms of brain sections of TgM83 mice (A and A') and α -syn KO mice (B and B') incubated with [18 F]BF227. Left side: corresponding anatomic sections in the cerebellum and the brainstem (A, B) and in the hippocampus and the thalamus (A', B'). Pseudocolor scale is from low (white) to high binding levels (gray).

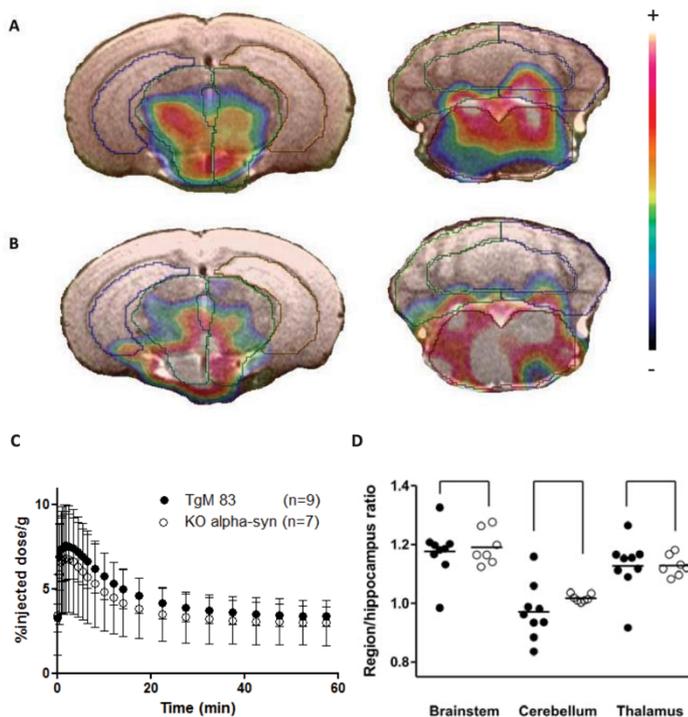


Fig. (4). MRI and corresponding PET coronal views of brainstem, cerebellum, thalamus and hippocampus in TgM83 (A) and α -syn KO mice (B); (C) Representative average time-activity curves (\pm SEM) of [¹⁸F]BF227 in the brain; (D) Comparison of average region/hippocampus [¹⁸F]BF227 ratios in TgM83 and α -syn KO mice.

thalamus, closely resembling authentic human pathological inclusions. C57Bl/6S mice deleted of the α -syn locus were chosen as controls, instead of wild type (WT) mice, in order to obtain the best term comparisons for imaging studies toward this target. These *in vitro* results strengthened our choice of hippocampus as the reference region for imaging analysis, e.g. a region in which the target (α -syn aggregates) is lacking.

To our knowledge, this study is the first to describe PET *in vitro* and *in vivo* imaging in a synucleinopathy mouse model. Our microPET data revealed an excellent brain uptake of [¹⁸F]BF227, confirming a previous study realized in non-transgenic mice [8]. However, despite these favorable pharmacokinetic conditions and the validated animal model of synucleinopathy expressing α -syn deposition with β -sheet structures, the failure to detect a significant difference in [¹⁸F]BF227 binding in the brain of TgM83 mice compared with α -syn KO mice was unexpected. Several reasons can be evoked to explain this lack of [¹⁸F]BF227 specific binding.

The first reason could be linked to α -syn structure. It was recently described that α -syn can be expressed under different polymorphisms leading to a molecular signature possibly different in α -syn neurodegenerative disorders [17]. Despite the fact that α -syn inclusions in our mice recapitulate several aspects of the typical characteristics of human inclusions

[11], it cannot be excluded that [¹⁸F]BF227 has different affinities according to the expressed structure.

The second reason could be the cellular localization of α -syn aggregates. In the case of MSA patients, cytoplasmic inclusions occur predominantly in oligodendroglial cells [18, 19]. The fact that a higher *in vivo* [¹⁸F]BF227 binding was measured in MSA patients [10] could be in favor of a specific binding to glial cytoplasmic α -syn inclusions. In other synucleinopathies like PD and DLB, these α -syn inclusions in Lewy bodies and Lewy neurites are mainly located in the neurons [20]. Since an *in vitro* study showed that [¹⁸F]BF227 failed to bind to pure dementia with Lewy bodies brain homogenates [9], it can be hypothesized that [¹⁸F]BF227 has a lower binding level towards α -syn inclusions that are located in neurons. It would therefore be of great value to identify more precisely the cellular localization of α -syn inclusions in our animal model.

The third reason could be linked to the affinity of [¹⁸F]BF227 toward α -syn inclusions. It is known in PET imaging that the binding of a radiotracer with a good imaging contrast is a function of its affinity for the site (Kd) relative to the density (Bmax) of that binding site. Consequently, most CNS imaging agents used as radiotracers have a Bmax/Kd ratio higher than ten [7]. According to this rule, and by the fact that [¹⁸F]BF227 binds to α -syn fibrils with an

affinity (K_D) close to 10 nM [9], the density of α -syn inclusions to achieve a good [^{18}F]BF227 image should be locally higher than 100 nM (as the B_{max} , expressed in molar units), particularly at the level of Lewy bodies or aggregation sites. The relatively modest affinity of [^{18}F]BF227 for α -syn fibrils gives a modest B_{max}/K_D ratio which precludes an intense binding to these targets. If fluorescence measurement of BF227 in brain sections of patients with PD, DLB, MSA revealed a specific binding, colocalized with anti-phosphorylated α -synuclein antibody [10], this study was performed at BF227 concentrations higher than 100 nM. These high concentrations of BF227 are incompatible with the low amount of [^{18}F]BF227 used in PET studies to be at a tracer dose. In other words, the quantity of [^{18}F]BF227 injected would be systematically lower than the requested quantity to achieve an optimal and detectable binding.

These points justify that [^{18}F]BF227 derivatives with higher affinity and selectivity toward α -syn inclusions should be synthesized. Another point to improve would be the specificity of [^{18}F]BF227.

CONCLUSION

[^{18}F]BF227 was proposed as an α -syn PET radiotracer in the current absence of other specific radiotracers. Here we evaluated for the first time this radiotracer in an accelerated mouse model of synucleinopathy presenting α -syn depositions in brainstem and thalamus. Both *in vivo* and *in vitro* studies showed that [^{18}F]BF227 does not bind to α -syn aggregates, highlighting that [^{18}F]BF227 PET has no suitable characteristics for monitoring experimental synucleinopathies and justifying the development of alternative α -syn PET radiotracers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fondation Plan Alzheimer (Alzheimer Plan 2008-2012).

REFERENCES

- [1] Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol* 58(2): 186-90 (2001).
- [2] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2(7): 492-501 (2001).
- [3] Trojanowski JQ, Lee VM. Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses. *Ann NY Acad Sci* 991: 107-10 (2003).
- [4] Vernon AC, Ballard C, Modo M. Neuroimaging for Lewy body disease: is the *in vivo* molecular imaging of alpha-synuclein neuropathology required and feasible? *Brain Res Rev* 65(1): 28-55 (2010).
- [5] Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 31(9): 411-7 (2010).
- [6] Lee CM, Farde L. Using positron emission tomography to facilitate CNS drug development. *Trends Pharmacol Sci* 27(6): 310-6 (2006).
- [7] Zimmer L, Luxen A. PET radiotracers for molecular imaging in the brain: past, present and future. *Neuroimage* 61(2): 363-70 (2012).
- [8] Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, *et al.* 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole: a novel PET agent for *in vivo* detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48(4): 553-61 (2007).
- [9] Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, Kudo Y, *et al.* *In vitro* characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. *Eur J Pharmacol* 617(1-3): 54-8 (2009).
- [10] Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, *et al.* *In vivo* visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 133(Pt 6): 1772-8 (2010).
- [11] Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34(4): 521-33 (2002).
- [12] Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, Lakhdar L, *et al.* Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* 33(9): 2225-8 (2012).
- [13] Betemps D, Verchère J, Brot S, Morignat E, Bousset L, Gaillard D, *et al.* Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological alpha-synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol Commun* 2(1): 29 (2014).
- [14] Lemaire C, Plenevaux A, *et al.* Solid phase extraction—an alternative to the use of rotary evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals. *J Labell Compd Radiopharmaceut* 42(1): 63-75 (1999).
- [15] Paxinos G, Franklin KBJ (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam ; Boston, Elsevier Academic Press.
- [16] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164(4): 1357-91 (2011).
- [17] Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, *et al.* Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4: 2575 (2013).
- [18] Beyer K, Ariza A. Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences. *J Neuropathol Exp Neurol* 66(11): 965-74 (2007).
- [19] Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 251(3): 205-8 (1998).
- [20] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645): 839-40 (1997).

Annexe 2 : sélection d'article n°2 (en page 41)

Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, **Lancelot S**. PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models. *CNS Neurosci Ther*. 2019 Jan;25(1):57-68. doi: 10.1111/cns.12978.

Il s'agit de la première étude d'imagerie microTEP qui explore le rôle de l' α -syn sur la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique dans trois modèles de souris exprimant des niveaux différents de protéine α -syn : une expression réduite dans le modèle KO pour l' α -syn, l'expression normale chez la souche wild type et une surexpression pathologique dans le modèle TgM83.

Received: 26 October 2017 | Revised: 24 April 2018 | Accepted: 25 April 2018

DOI: 10.1111/cns.12978

ORIGINAL ARTICLE

WILEY CNS Neuroscience & Therapeutics

PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models

Elise Levigoureux^{1,2}  | Caroline Bouillot³ | Thierry Baron⁴ | Luc Zimmer^{1,2,3} | Sophie Lancelot^{1,2,3}

¹Lyon Neuroscience Research Center, CNRS UMR5292, INSERM U1028, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

²Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³CERMEP-Imaging Platform, Lyon, France

⁴ANSES - French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Lyon, France

Correspondence

Luc Zimmer, CERMEP-Imaging Platform, Lyon, France.

Email: zimmer@univ-lyon1.fr

Summary

Aims: Alpha-synuclein (α -syn) aggregation is a neuropathological hallmark of neurodegenerative synucleinopathies. This in vivo study explored glucose metabolism and dopaminergic and serotonergic neurotransmission in KO α -syn, wild-type mice and an accelerated murine model of synucleinopathy (M83).

Methods: MicroPET acquisitions were performed in all animals aged 5–6 months using five radiotracers exploring brain glucose metabolism ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), dopamine neurotransmission ($[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$, $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$) and serotonin neurotransmission ($[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$, $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$). For all radiotracers, except $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, PET data were analyzed with a MRI-based VOI method and a voxel-based analysis.

Results: MicroPET data showed a decrease in $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ uptake in the caudate putamen of KO α -syn mice, in comparison with M83 and WT mice, reflecting a lower concentration of D_2 receptors. The increase in $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ uptake in M83 vs WT and KO mice indicates overexpression of $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ receptors. The lack of change in dopamine and serotonin transporters in all groups suggests unchanged neuronal density.

Conclusions: This PET study highlights an effect of α -syn modulation on the expression of the D_2 receptor, whereas aggregated α -syn leads to overexpression of $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ receptor, as a pathophysiological signature.

KEYWORDS

alpha-synuclein, animal model, dopamine, PET, serotonin

1 | INTRODUCTION

Alpha-synuclein (α -syn) is a soluble endogenous protein that typically assumes a random coil structure. If its exact functions remain uncertain,^{1,2} its preferential localization in presynaptic nerve terminals and interactions with vesicular phospholipids and proteins suggest a regulatory function in dopamine production, synaptic activity, and lipid vesicle trafficking.^{3–7} The term “synucleinopathy” refers collectively to a group of heterogeneous neurodegenerative disorders including

Parkinsonism, autonomic dysfunction, and nonmotor deficits.^{8–10} All these disorders share an acceleration of oligomerization or protofibrillization of mutant α -syn protein.^{11,12} In Parkinson's disease (PD) and Dementia with Lewy Bodies (DLB), α -syn tends to accumulate mostly in neurons, while in multiple system atrophy (MSA), there is extensive accumulation of α -syn in oligodendroglial cells and, to a lesser extent, in neurons.^{13–15} A few cases of familial PD have been linked to missense point mutations in α -syn with A53T, A30P, E46K, and more recently H50K and G51D.^{16–20}

As the pathogenesis of human synucleinopathy remains unclear, animal genetic models are highly valuable for understanding the role of this protein in these neurodegenerative disorders.^{21,22} Several strategies were used to produce transgenic mice with α -syn overexpression, sometimes considered rather simplistically as models of PD. Although mouse models do not fully reproduce the pathological changes seen in synucleinopathy patients (ie, dopaminergic cell loss, presence of typical Lewy bodies, etc.), these models have contributed to clarifying the mechanism of α -syn toxicity *in vivo*.²³⁻²⁵

One model of synucleinopathy consists of mice expressing the A53T mutant human α -syn, under the control of the mouse prion promoter.²³ These mice develop severe motor impairments during aging, with neuronal accumulation of aggregated α -syn phosphorylated at serine 129 in the brain, reminiscent of that found in brain lesions of patients with PD.²³ In terms of the behavior of this animal model, several authors reported anxious behavior, detected at the age of 2 months,²⁶⁻²⁸ before the onset of motor impairment which typically occurs at > 8 months of age.²³ These motor manifestations were linked to loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta.²⁹ Our team and others recently developed an alternative animal model with accelerated disease progression, more convenient for longitudinal studies and showing less interindividual variability.^{30,31} Briefly, it consists in intracerebral inoculation of young (6-8 weeks old) homozygous transgenic mice with brain homogenates from aged M83 mice with motor impairment. The inoculated mice develop the disease before the age of 8 months, typically 100-150 days after the experimental challenge, and systematically present α -syn aggregates in the brainstem and midbrain.^{23,32,33} Another animal model useful for understanding the pathophysiological involvement of α -syn is the KO mouse model lacking α -syn. These knockout mice, generated by partially deleting the SNCA gene, are viable, with normal lifespan.⁶ While α -syn RNA and protein are undetectable in KO mice, their brains appear largely normal.

Neither murine model has yet been explored in terms of neurotransmission status. The aim of this study was therefore to study, *in vivo* and for the first time, glucose metabolism and dopaminergic and serotonergic neurotransmission in murine models with different α -syn statuses: (i) an α -syn KO mouse, to reveal the influence of physiological α -syn; (ii) the corresponding wild-type model; and (iii) the M83 mouse model of synucleinopathy at an early disease stage, before expression of motor impairment.

The dopamine system was chosen because there is a large literature on the potential involvement of α -syn in the regulation of dopamine neurotransmission³⁴ and involvement in the pathophysiology of Parkinson's disease.³⁵ Although degeneration of midbrain dopamine neurons is at the core of the disease and is the main explanation for the motor disability, it is well-known that α -syn pathology is more widely distributed in the brain: Nondopaminergic systems are also affected, including the serotonergic neurons. Therefore, it is likely that α -syn function or dysfunction in serotonergic systems contributes to the wider spectrum of symptoms, such as cognitive impairment and emotional disturbance.³⁶

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and study schedule

Studies were performed with the accelerated mouse model of synucleinopathy previously described.³¹⁻³³ In brief, mice were 5 months old at the time of study, that is, 3 months after stereotactic inoculation of brain homogenate from aged M83 mice into the striatum (2 μ L per mouse). At this time, none of the studied mice showed any motor signs. For all experiments, the transgenic mice were compared to age-matched wild-type (WT) C57Bl/6J mice and knock-out (KO) α -syn C57Bl/6S mice, presenting a deletion of the α -syn locus (Harlan, Gannat, France).

Fifty-nine female and nine male mice were used: 21 transgenic, 24 WT, and 22 KO. Due to the sensitivity of this animal model to repeated anesthesia and to PET radiotracer availability issues, not all animals could be studied at each test. All experiments were performed in accordance with the European guidelines for care of laboratory animals (2010/63/EU) and were approved by the University of Lyon review board.

The study was chronologically organized as follows (Figure 1): (i) animals were observed daily to detect any change in motor behavior; (ii) in their fifth month of life, the animals underwent MRI and microPET imaging examination (each animal had a maximum 5 microPET examinations, with 5 different radiotracers, within 1 month maximum; (iii) at the end of this imaging period, the animals were sacrificed and explored *in vitro* (detection of aggregated alpha-synuclein by Western blot and Thioflavin-S analysis).

2.2 | Premortem magnetic resonance imaging (MRI)

In vivo imaging in mice requires precise and reproducible delineation of brain structures. This segmentation, performed on brain MRI images, is needed for extraction of regional time-activity curves in PET studies.

MRI was performed on a 7-Tesla Bruker system (Biospec®, Bruker Biospin GbmH, Germany) coupled to Bruker BGA12 (450 mT/m) gradients. A 72-mm diameter Bruker volume coil was used for signal emission and a 15-mm-diameter surface coil for signal detection, to provide the best coverage around the mouse brain. Axial anatomical T2-weighted RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) images were obtained with the following parameters: effective echo time = 60.28 ms, repetition time = 7500 ms, in-plane resolution 78 \times 78 μ m² and 47 slices of 330 μ m thickness, RARE factor = 8, acquisition time = 24 minutes. The MRI images were obtained from scans of C57Bl/6J mice (WT).

The T2 MRI was manually segmented into 20 volumes of interest (VOIs): for example, right and left frontal, parietal, cingulate, temporal and occipital cortexes, right and left hippocampus, caudate putamen, thalamus, and cerebellum, and cerebellar white matter and brainstem, according to Paxinos and Watson's stereotaxic atlas.³⁷ We used this single atlas dataset to extract regional PET measures.

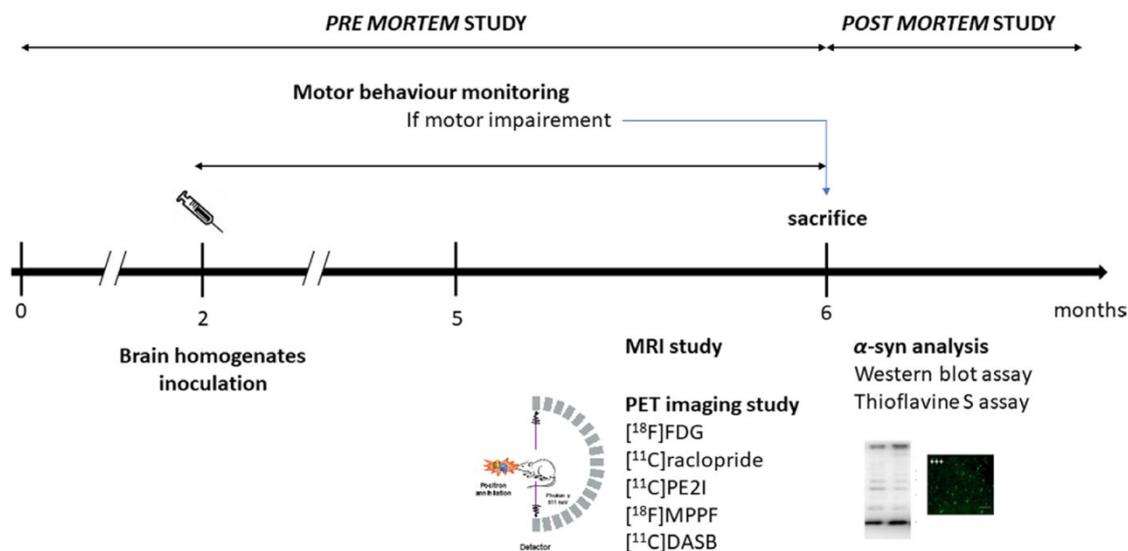


FIGURE 1 Organization of the experimental protocol. Animals were observed daily to detect any change in their motor behavior; in their fifth month, animals had anatomical MRI and microPET imaging examinations (each animal had a maximum of 5 microPET with 5 different radiotracers for a total of less than 1 month); at the end of this imaging period, animals were sacrificed and explored *in vitro* (detection of aggregated α -syn by Western blot and Thioflavin-S analysis)

2.3 | Premortem microPET imaging

2.3.1 | Radiotracers

The radiopharmaceutical [^{18}F]FDG (GlucoTEP[®]) was obtained from Cyclopharma (Janneyrias, France) and had a chemical and radiochemical purity exceeding 98%.

[^{11}C]raclopride, a D_2 receptor antagonist, was synthesized in-house, in the CERMEP imaging platform. Its chemical and radiochemical purity were determined by high-performance liquid chromatography and exceeded 95%. Specific activity from the injected radiotracer ranged from 33.10^3 MBq/ μmol to 185.10^3 MBq/ μmol (0.9–5.0 Ci/ μmol).

[^{11}C]PE2I, a dopamine transporter (DAT) radiotracer, was synthesized in-house, in the CERMEP imaging platform. Its chemical and radiochemical purity were determined by high-performance liquid chromatography and exceeded 95%. Specific activity from the injected radiotracer ranged from 33.10^3 MBq/ μmol to 240.10^3 MBq/ μmol (0.9–6.5 Ci/ μmol).

[^{18}F]MPPF, a 5-HT_{1A} receptor radiotracer, was synthesized in-house, in the CERMEP imaging platform. Its chemical and radiochemical purity were determined by high-performance liquid chromatography and exceeded 98%. Specific activity from the injected radiotracer ranged from 85.10^3 MBq/ μmol to 326.10^3 MBq/ μmol (2.3–8.8 Ci/ μmol).

[^{11}C]DASB, a serotonin transporter (SERT) radiotracer, was synthesized in-house, in the CERMEP imaging platform. Its chemical

and radiochemical purity were determined by high-performance liquid chromatography and exceeded 95%. Specific activity from the injected radiotracer ranged from 26×10^3 MBq/ μmol to 122×10^3 MBq/ μmol (0.7–3.3 Ci/ μmol).

2.3.2 | Imaging

Animals were anesthetized using isoflurane (4% induction and 2% maintenance). Breathing rate was monitored throughout the experiment. After catheterization of a caudal vein, the mouse head was centered in the field of view (FOV) of the PET/CT scanner (Inveon[®], Siemens, Knoxville, TN, USA). PET scans were acquired in list mode, with a nominal in-plane resolution of ~ 1.4 mm full-width-at-half-maximum in the center of the FOV. Images were reconstructed with attenuation and scatter correction by a 3D-filtered back-projection algorithm (Hamming filter; cutoff frequency 0.5 cycles/pixel) and a zoom factor of 2. The reconstructed volume was constituted of 159 slices of 128×128 voxels, in a bounding box of $49.7 \times 49.7 \times 126$ mm and with voxel size $0.388 \times 0.388 \times 0.796$ mm. The dynamic images were analyzed with the INVEON research Workplace (IRW, Siemens).

Sixty-minute list-mode acquisition started immediately after intravenous caudal injection of the radiotracer. Injected doses were 8.3 ± 1.1 MBq; 8.3 ± 0.6 MBq; 7.4 ± 0.8 MBq and 9.0 ± 0.5 MBq for [^{11}C]raclopride, [^{11}C]PE2I, [^{18}F]MPPF, and [^{11}C]DASB, respectively.

For [^{18}F]FDG imaging, a 20-minute list-mode acquisition was made 1 hour after intra-peritoneal injection of 7.2 ± 2.2 MBq.

2.3.3 | Data analysis

Registration and normalization between PET and MRI were computed. PET measures were extracted using the resliced MRI in the PET space. For all radiotracers, PET data were analyzed in two ways:

1. *MRI-based volume of interest (VOI) method.* PET data were extracted using MRI-based VOIs and expressed as SUVs (Standard Uptake Values). Target-to-reference tissue standardized uptake value ratios (SUVRs) were also calculated using cerebellar gray matter as reference region, except for [^{18}F]FDG, for which the temporal cortex was chosen as reference. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] 5.0 software. Two-way ANOVA with Bonferroni's test for post hoc correction was performed for analyses within subregions. Values were considered to be significantly different for P -values lower than 0.05.

2. *Voxel-based analysis.* Data were analyzed using Statistical Parametric Mapping software (SPM 12, The Wellcome Trust Center for Neuroimaging, London, UK). We first build our own CT template: All CT scans of all animals were first summed to generate an average image. Each CT scan was then spatially normalized onto this average image, and a template was generated by averaging all the individual normalized CT scans. Each PET volume was then spatially normalized using our custom CT template and smoothed using an isotropic Gaussian filter [$1.4 \times 1.4 \times 1.4$ mm]. SPM comparisons were performed using one-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), that is, comparisons of M83 vs WT mice vs KO α -syn mice and comparison of WT mice vs KO α -syn mice. Global activities were normalized by proportional scaling using the whole brain mean activity of each radiotracer computed for each scan within a template mask of the brain. SPM-t maps were thresholded at $P < 0.001$, uncorrected, at the voxel level. Only bilateral clusters were considered significant at this threshold if a-priori hypothesis existed; otherwise, $P_{\text{FWE}}\text{-corrected} < 0.05$ was used.

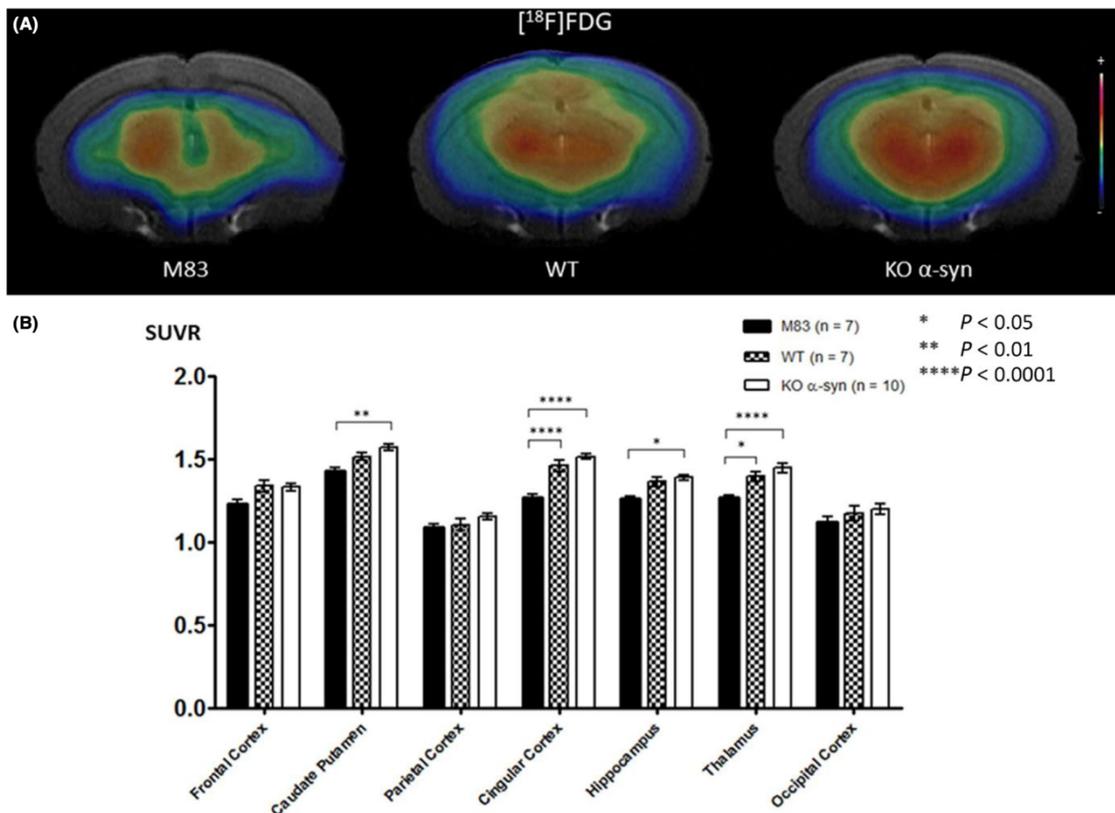


FIGURE 2 A, Coregistration of MRI and PET images in the transverse plane for M83, WT, and KO α -syn mice groups. The PET images represent the summed distribution of [^{18}F]FDG, a metabolism radiotracer. B, Results of [^{18}F]FDG with MRI-based VOI analysis (expressed as SUVr, mean \pm SEM) showed significantly decreased radiotracer uptake in the caudate putamen area, parietal cortex, hippocampus, and thalamus of M83 vs KO α -syn mice

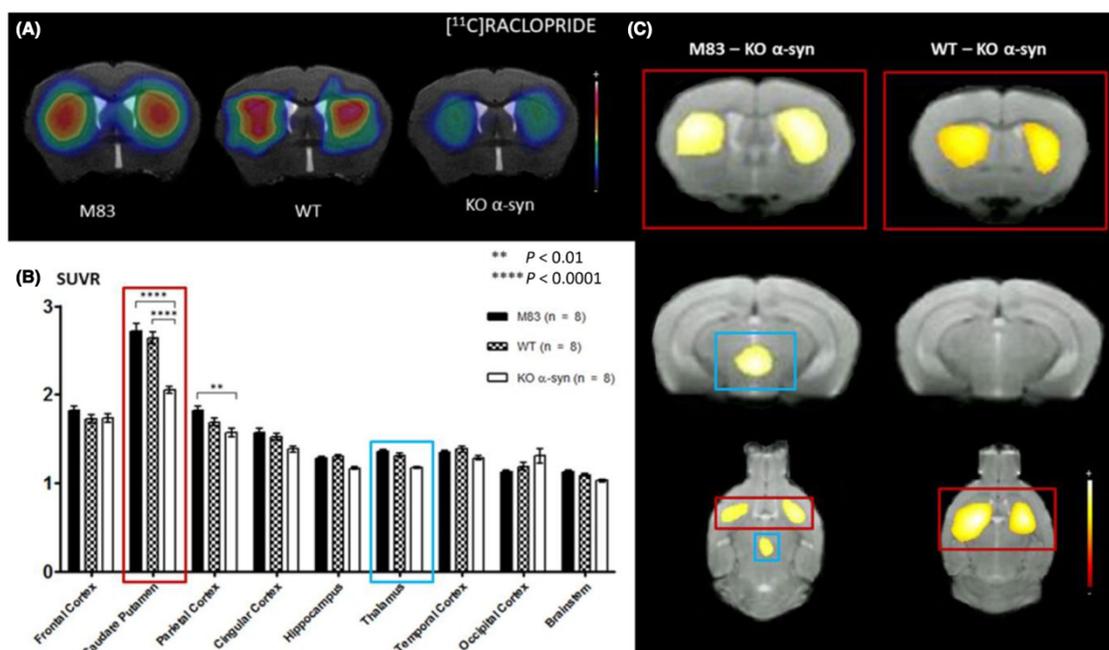


FIGURE 3 A, Coregistration of MRI and PET images in the transverse plane for M83, WT, and KO α -syn mice groups. The PET images represent the summed distribution of $[^{11}\text{C}]$ raclopride, a D_2 receptor antagonist radiotracer. B, Results of $[^{11}\text{C}]$ raclopride with MRI-based VOI analysis (expressed in SUVR, mean \pm SEM) showed significantly decreased uptake in the caudate putamen area and parietal cortex of KO α -syn vs M83 mice. C, Results of voxel-based analysis, overlaid onto MRI template (coronal slice), reflecting a significant ($p_{\text{FWE-corrected}} < 0.05$) regional decrease in $[^{11}\text{C}]$ raclopride uptake in KO α -syn mice compared to M83 and WT mice

2.4 | Postmortem alpha-synuclein detection by Western blot

After euthanasia, mouse brains were carefully removed and immediately frozen in dry ice. Brain tissue was collected, and homogenates were produced. About 20% of homogenates from a half brain were prepared in high-salt buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 750 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1% phosphatase and protease inhibitor cocktails), using a mechanical homogenizer (grinding balls, FastPrep FPI20, Thermo). After heat denaturation (5 minutes at 100°C), proteins were separated by electrophoresis using 12% SDS polyacrylamide gels before being electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). α -syn was probed with either mouse monoclonal antibody (mAb) clone 42 against α -syn (1:2000) (BD Biosciences, ref 610787), or rabbit mAb against pSer129 α -syn (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK, ref ab51253). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (Ig) secondary antibodies (1:1000). The immunocomplexes were visualized with chemiluminescent reagents (Supersignal WestDura, Thermo, ref 34076), followed by exposure on Biomax MR Kodak films, or CL-Exposure films, and by analysis on dedicated software (Versa Doc system and Quantity One software, both from Bio-Rad).

2.5 | Postmortem Thioflavin-S analysis

Coronal sections (30 μm thick) were cut across the brainstem, cerebellum, thalamus, hippocampus and cingulate and frontal cortices using a -20°C cryostat (Leica), thaw-mounted on SuperFrost[®] glass slides and allowed to air-dry before storage at -80°C until use. Brain sections were stained with thioflavin-S (Sigma Aldrich). Staining was performed using sections postfixed in 4% paraformaldehyde. Sections were incubated in thioflavin-S 0.05% followed by NaOH + H_2O treatment. The induced fluorescence was observed on an imaging microscope (Axioplan-2, Zeiss; Oberkochen, Germany), with an FITC filter (excitation 470 ± 20 nm, emission >515 nm). Images were captured using a digital camera interfaced with an image-analysis computer (Axiovision 3.0 software, Zeiss).

3 | RESULTS

3.1 | Imaging

3.1.1 | $[^{18}\text{F}]$ FDG neuroimaging

$[^{18}\text{F}]$ FDG uptake was decreased in the mouse model of synucleinopathy in the whole brain. The difference was significant for 4 regions: caudate putamen, cingulate cortex, hippocampus, and

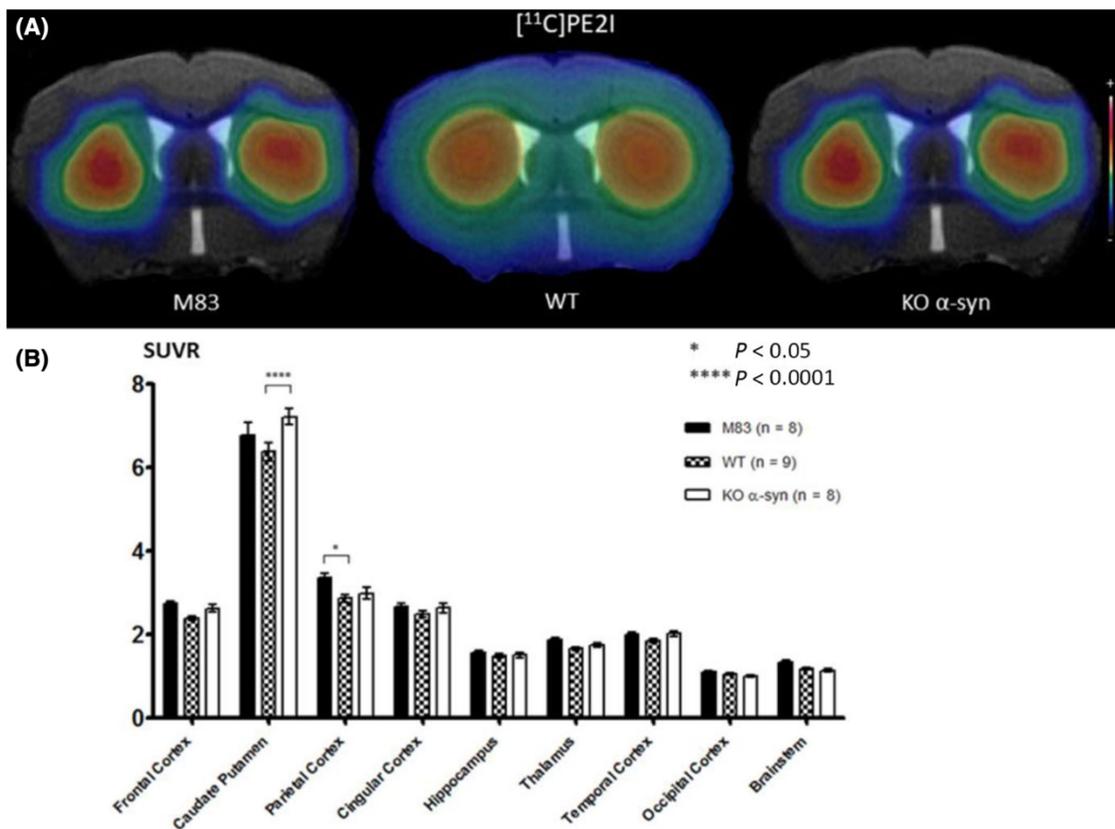


FIGURE 4 A, Coregistration of MRI and PET images in the transverse plane for M83, WT, and KO α -syn mice groups. The PET images represent the summed distribution of $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$, a dopamine transporter radiotracer. B, Results of $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ with MRI-based VOI analysis (expressed in SUVR, mean \pm SEM) showed significantly increased uptake in the caudate putamen area of KO α -syn vs WT mice and significantly increased uptake in the parietal cortex of M83 vs WT mice

thalamus; SUVRs were 1.42 ± 0.03 , 1.26 ± 0.03 , 1.26 ± 0.02 , and 1.27 ± 0.02 , respectively, in M83 mice, vs 1.52 ± 0.02 (NS), 1.46 ± 0.04 ($P < 0.0001$), 1.37 ± 0.03 (NS) and 1.40 ± 0.03 ($P < 0.05$) in WT mice and 1.57 ± 0.02 ($P < 0.01$), 1.52 ± 0.02 ($P < 0.0001$), 1.39 ± 0.02 ($P < 0.05$), and 1.45 ± 0.03 ($P < 0.0001$) in KO α -syn mice (Figure 2A,B).

3.1.2 | $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ PET neuroimaging

According to the MRI-based VOI method, KO α -syn mice (Figure 3A) showed a significant decrease in $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ uptake in the caudate putamen compared to M83 and WT mice: SUVR was 2.05 ± 0.04 in KO α -syn mice vs 2.72 ± 0.08 in M83 mice ($P < 0.0001$), and 2.64 ± 0.07 ($P < 0.0001$) in WT mice (Figure 3B). A significant decrease in $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ binding was also observed in parietal cortex in KO α -syn mice (SUVR = 1.57 ± 0.05) compared to the M83 model (SUVR = 1.82 ± 0.05) ($P < 0.01$).

The voxel-based analysis method showed a significant (p_{FWE}^- corrected < 0.05) regional decrease in $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ uptake in

KO α -syn mice compared to M83 and WT mice. Comparison between KO α -syn and M83 mice revealed two significant clusters of 13.45 mm^3 and 16.55 mm^3 found in the right and left caudate putamen regions, respectively (Figure 3C, in red), and one of 3.82 mm^3 in the thalamus (Figure 3C, in blue). Comparison between KO and WT mice revealed two significant clusters of 11.59 mm^3 and 15.36 mm^3 found in the right and left caudate putamen regions, respectively (Figure 3C, in red). No significant differences in $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ binding were observed between M83 and WT mice with these two methods.

3.1.3 | $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ neuroimaging

MicroPET images (Figure 4A) showed a trend for increased $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ uptake in the caudate putamen area in KO α -syn vs M83 and WT mice: SUVR, 7.23 ± 0.21 , 6.77 ± 0.32 and 6.38 ± 0.21 , respectively. DAT overexpression seemed to be observed in the parietal cortex: SUVR, 3.37 ± 0.11 for M83, 2.87 ± 0.09 for WT and 2.98 ± 0.14 for KO α -syn mice. Results are shown in Figure 4B.

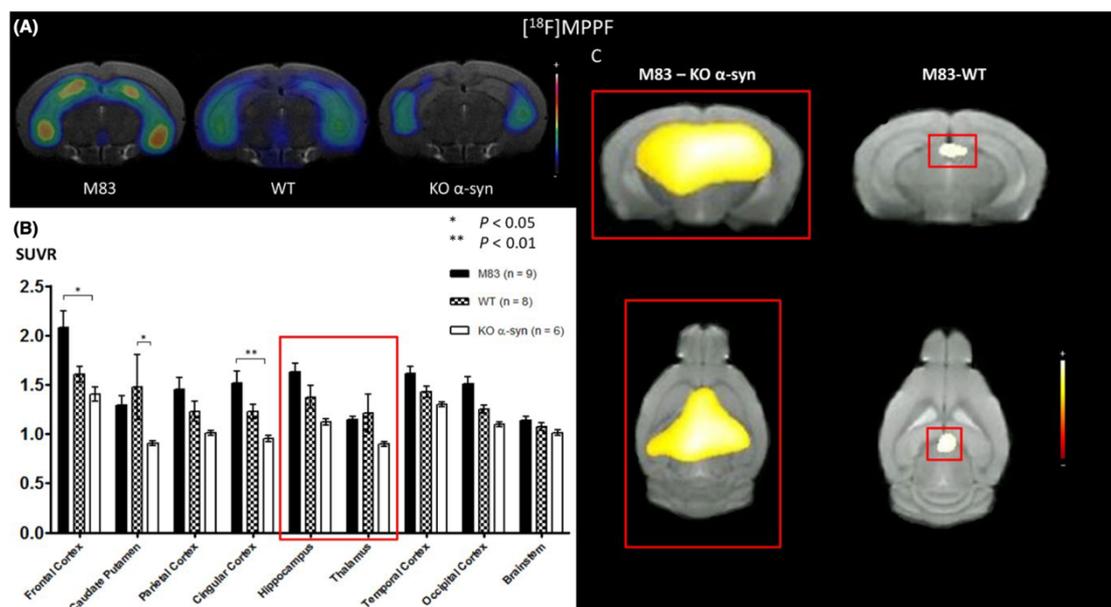


FIGURE 5 A, Coregistration of MRI and PET images in the transverse plane for M83, WT, and KO α -syn mice groups. The PET images represent the summed distribution of [^{18}F]MPPF, a 5-HT $_{1A}$ receptor antagonist radiotracer. B, Results of [^{18}F]MPPF with MRI-based VOI analysis (expressed in SUVR, mean \pm SEM) showed significant differences of uptake in the frontal and cingulate cortex of M83 vs KO α -syn mice. C, Results of voxel-based analysis, overlaid onto MRI template (coronal slice), reflecting a significant ($P_{\text{FWE-corrected}} < 0.05$) regional increase of [^{18}F]MPPF uptake in hippocampus and thalamus in M83 mice compared to KO α -syn mice. Results of voxel-based analysis, overlaid onto MRI template (coronal slice), revealing one cluster of increased [^{18}F]MPPF uptake ($P < 0.001$ uncorrected) in thalamus in M83 mice compared to WT mice

Voxel-based analysis revealed no significant differences for [^{11}C]PE2I uptake between the three groups of mice.

3.1.4 | [^{18}F]MPPF neuroimaging

With the MRI-based VOI method, microPET images (Figure 5A) showed significant differences in [^{18}F]MPPF uptake in the M83 mouse model of synucleinopathy in comparison with KO α -syn mice. SUVRs were 2.08 ± 0.17 and 1.51 ± 0.12 in the frontal and cingulate cortices in M83 mice, respectively, vs 1.61 ± 0.08 (NS) and 1.23 ± 0.10 (NS) in WT mice and 1.40 ± 0.07 ($P < 0.05$) and 0.95 ± 0.03 ($P < 0.01$) in KO α -syn mice (Figure 5B). Significant differences in [^{18}F]MPPF uptake were also observed between WT and KO α -syn mice (< 0.01) in the caudate putamen, and there were no significant differences between M83 vs KO α -syn and WT mice in other brain regions, particularly in the hippocampus but also in parietal, temporal, and occipital cortices and, less obviously, in the brainstem. A staircase graph was observed, in which the upper third was represented by M83 mice and the lower third by KO α -syn mice, with the mid-third represented by WT mice.

Voxel-based analysis revealed a significant ($P_{\text{FWE-corrected}} < 0.05$) regional increase in [^{18}F]MPPF uptake in M83 mice

compared to KO α -syn mice. One significant cluster of 55.26 mm^3 was found in the hippocampus and thalamus areas (Figure 5C, in red). Comparison of M83 with WT mice revealed one cluster of 0.99 mm^3 ($P < 0.001$ uncorrected) in the thalamus (Figure 5C in red). No significant differences in [^{18}F]MPPF binding were observed between WT and KO α -syn mice using this method.

3.1.5 | [^{11}C]DASB neuroimaging

No significant differences in [^{11}C]DASB uptake were observed between the M83, WT, and KO mice groups, whatever the analysis method (Figure 6A,B).

3.2 | Animal monitoring

Results of behavioral monitoring are shown in Figure 7A. During the PET study period, 55% of mice developed neurological symptoms and were therefore sacrificed, in accordance with the guidelines for care of laboratory animals. Other mice were sacrificed at the end of PET study. All mice were between 5 and 6 months old.

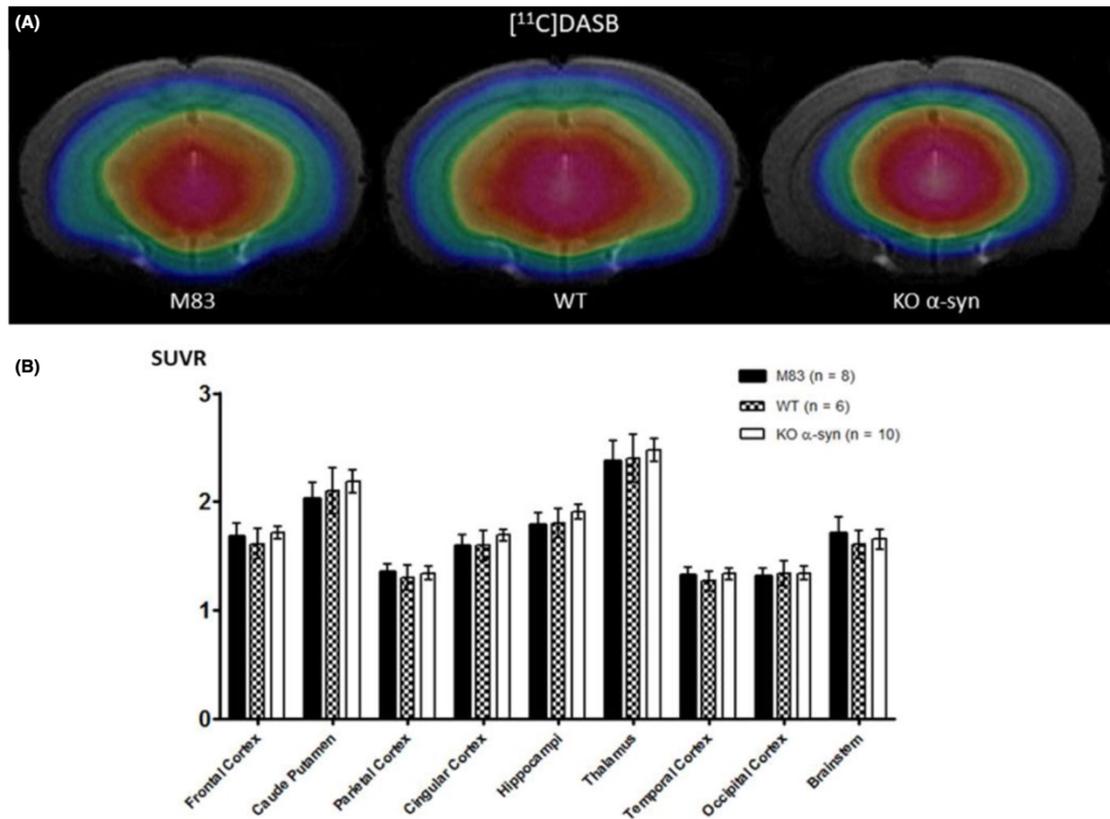


FIGURE 6 A, Coregistration of MRI and PET images in the transverse plane for M83, WT, and KO α -syn mice groups. The PET images represent the summed distribution of [^{11}C]DASB, a serotonin transporter radiotracer. B, Results of [^{11}C]DASB with MRI-based VOI analysis (expressed in SUVR, mean \pm SEM). Data showed no significant differences in binding between the 3 groups of mice, regardless of the region of the brain studied

3.3 | Alpha-synuclein detection by Western blot and thioflavin-S analysis

Western blot studies in brain tissue revealed insoluble pSer129 α -syn in M83 mice. Accumulation of α -syn was not detected in α -syn KO mice (Figure 7B).

Thioflavin-S staining in brain sections showed the presence of β -sheet structures in the brainstem and thalamus in M83 mice. No fluorescent signal was observed in the frontal or cingulate cortices, cerebellum or hippocampus (Figure 7C). Fluorescence was negative in WT and α -syn KO brain sections for all regions tested (data not shown).

4 | DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that explored the role of α -syn on neurotransmission using three animal models that express different levels of the protein: reduced expression in the KO model, physiological

expression in the WT model, and pathological overexpression in the accelerated M83 model of synucleinopathy. We used PET as a unique nuclear medicine technology, enabling *in vivo* measurement of physiological processes, biochemical pathways and neurotransmitters, and thus having an important role in studying the pathophysiology and pharmacology of the brain.³⁸ One of the main contributions of micro-PET is that it allows the same experiments to be performed in rodents, nonhuman primates, and humans, enabling longitudinal studies and facilitating translation between basic and clinical research, particularly in neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's.^{39,40}

Our study focused on the prodromal stage of the accelerated animal model of synucleinopathy, with the aim of detecting changes in neurotransmission, which could be translated into clinical research as early biomarkers of neurodegenerative disease. At this stage (ie, the age of 5 months), pathological α -syn was detected mainly in the brainstem and more moderately in the thalamus; no or only moderate neurological/motor symptoms were observed. These results are close to those described previously³¹ and thus confirm the robustness of this animal model.

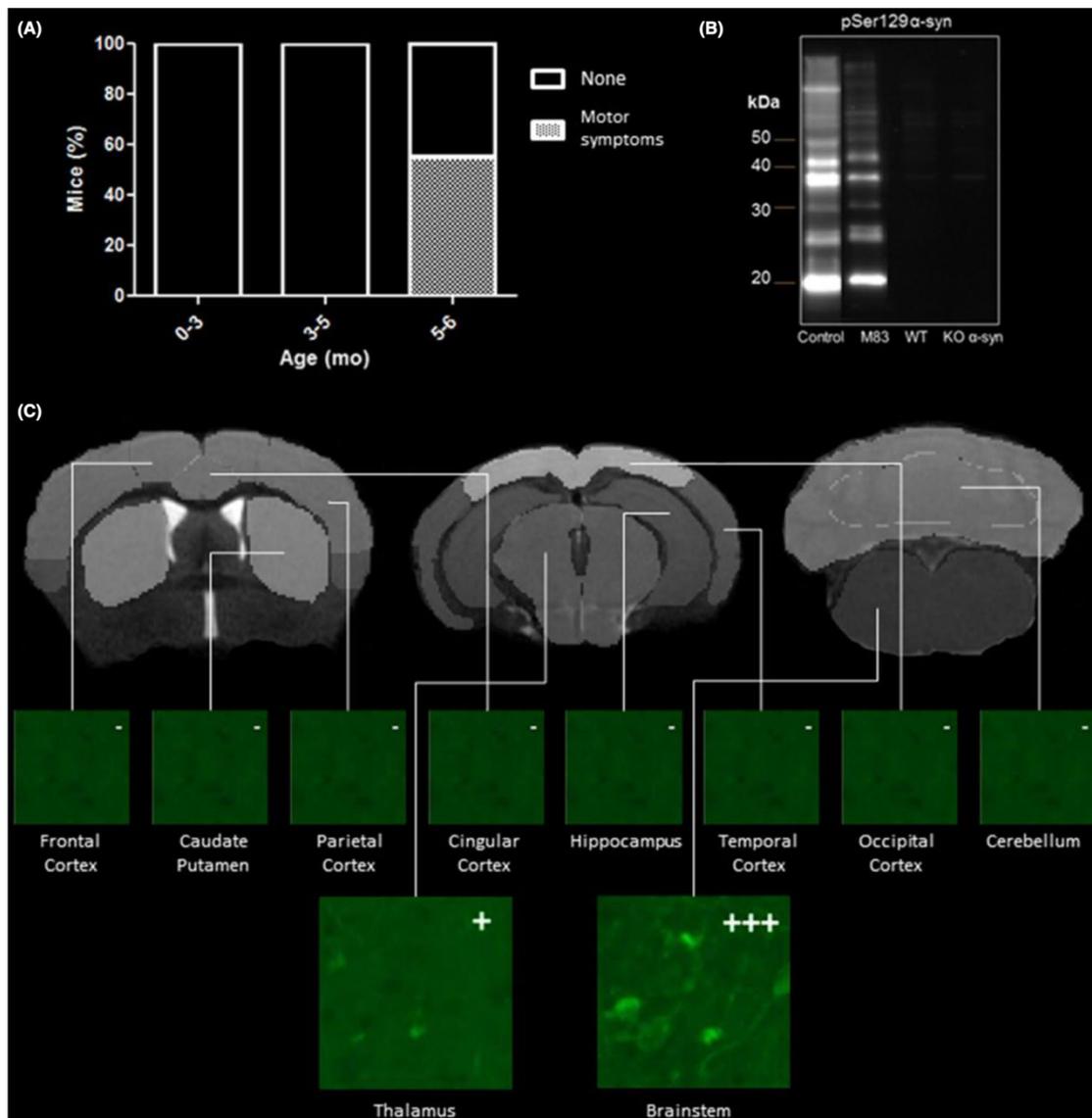


FIGURE 7 A, Panels show the occurrence of symptoms. B, Western blot detection of α -syn using antibody pSer129 α -syn in insoluble fraction after biochemical extraction of 20% half-brain homogenates (m/v) from M83, W,T and α -syn KO mice. The positions of molecular mass markers are depicted on the left. The Western blot shows accumulation of insoluble and aggregated α -syn in M83 mice and total absence in WT and α -syn KO mice (arrows). The positive control consists of symptomatic M83 brain tissue. C, Thioflavin-S staining in M83 mice: β -sheet structures are revealed mainly in the brainstem and, to a lesser extent, in the thalamus. No staining is visible in other VOIs studied

MicroPET data obtained with [18 F]FDG revealed early hypometabolism in many brain regions of M83 mice, such as the caudate putamen, cingulate cortex, hippocampus, and thalamus. Although this decrease in glucose metabolism can be compared with similar studies in Parkinson's disease patients,^{39,40} the limitation of this metabolic tracer is its lack of specificity and

identification of specific molecular events. We therefore focused imaging exploration on dopaminergic and serotonergic pathways, using, for each system, a receptor and a transporter radiotracer: D₂ receptors ([11 C]raclopride), dopamine transporter ([11 C]PE2I), 5-HT_{1A} receptors ([18 F]MPPF), and serotonin transporters ([11 C]DASB).

In terms of methodology, the study was based on two classical methods of PET data processing, not in order to compare both methods but rather to be as exhaustive as possible in interpreting the PET data. MRI-based VOI analysis involves a priori assumptions about the cerebral localization of the results. For the predefined analysis regions, we drew 20 VOIs throughout the brain covering the main cerebral structures. The limitation of this approach was mainly that significant variations were only observed after further segmentation of VOI "meta-structures".⁴¹ Voxel-based analysis is a method based on the absence of a priori assumptions of brain regions of interest. It provides more information on the location of changes in neurotransmission, but has the disadvantage of being less sensitive.

Concerning the exploration of dopaminergic neurotransmission, the MRI-based VOI method showed lower uptake of [¹¹C]raclopride in the caudate putamen of KO α -syn compared to M83 and WT mice. Voxel-based analysis showed the same results: Two significant clusters were identified in the caudate putamen area, and one more in the thalamus comparing M83 vs KO α -syn mice. Moreover, two significant clusters were identified in the caudate putamen area comparing WT vs KO α -syn mice. These results confirm the role of α -syn in dopamine neurotransmission. The low density of D₂ receptors we observed is in accordance with the slight deficit of dopaminergic neurons in the substantia nigra of KO mice.^{42,43} Our results are consistent with the hypothesis that α -syn is important for normal synaptic function and integrity.

Complementarily, PET exploration with [¹¹C]PE2I did not reveal any differences in DAT density between the three groups. SPM analysis confirmed this lack of effect of α -syn status on transporter density. These results can be compared with previous studies reporting that DAT function increased occasionally in 2- to 4-month-old A53T mice but not at older ages when symptoms occurred.²⁷ In our study, we were not able to follow longitudinally our mouse model because of the vulnerability of mice to repeated anesthesia. Therefore, we cannot exclude that a transitory overexpression of DAT might have occurred at an earlier stage of the M83 model of synucleinopathy. Our results, showing stable DAT binding, are in favor of unchanged dopaminergic neuron density in the three mouse models. This is in agreement with a previous electron microscopy study showing that the absence of α -syn in KO transgenic mice had no effect on the levels of synaptic proteins, including synapsin, synaptophysin, and SNAP-25.⁶ More generally, the presence of physiological or aggregated α -syn seems to have functional (D₂ density) more than neuroanatomical effects (DAT density) on dopaminergic neurotransmission.

Complementary microdialysis studies would help to understand the links between dopamine neurotransmission and physiological and pathological α -syn expression.

Concerning the serotonergic neurotransmission, the MRI-based VOI method showed a significant increase in [¹⁸F]MPPF binding in the frontal and cingulate cortices in M83 vs KO α -syn mice. In these regions, no significant differences were observed between M83 and WT mice or between WT and KO α -syn mice. Voxel-based

analysis also revealed an increase in [¹⁸F]MPPF binding in the hippocampus and/or thalamus in M83 vs WT and KO α -syn mice. However, different brain regions were identified according to the chosen method.⁴⁴ This difference would probably fade if the number of animals was increased. The general trend of results was the same: overexpression of 5-HT_{1A} receptors at the early stage of the model of synucleinopathy. At this stage, it would be interesting to investigate whether these receptors are the consequence of transient astroglial overexpression of 5-HT_{1A} receptors, compensating neuronal decrease of the same receptors.⁴⁵

Complementarily, PET scanning of serotonin transporters by [¹¹C]DASB showed no modification of the transporter, in favor of unchanged serotonergic neuron density. This is in agreement with previous studies showing that SERT expression did not change between the ages of 8 and 12 months in M83 mice,²⁸ with no loss of serotonergic neurons.⁴⁶ Here again, complementary microdialysis studies would help to understand the links between serotonin neurotransmission and physiological and pathological α -syn expression.

5 | CONCLUSION

This study highlights the influence of α -syn on the dopaminergic and serotonergic systems. Physiological α -syn modulates the expression of the D₂ receptor, whereas only the pathological α -syn modulates the expression of the 5-HT_{1A} receptor, as a pathophysiological signature. These results are original but need now to be completed, to decipher these subtle pathophysiological mechanisms more precisely. Microdialysis studies in awake animals would help to understand the links between dopamine and serotonin neurotransmission on the one hand and physiological and pathological α -syn expression on the other. More generally, our results highlight the interest of *in vivo* PET neuroimaging with the same radiotracers for the exploration of neurotransmission reactivity in the synucleinopathy models. Finally, this PET translational approach encourages designing clinical studies associating the same radiopharmaceuticals to explore early stages of neurodegenerative pathologies, such as Parkinson's disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all members of the chemistry unit of the CERMEP for tracer radiosyntheses (Dr D. Le Bars, F. Liger, F. Bonnefoi, T. Lecker, C. Tourville) and Jérôme Redouté, from the PET department of the CERMEP for his contribution to data analysis. This work was performed within the framework of the LABEX PRIMES of the University of Lyon, operated by the French National Research Agency (ANR).

CONFLICTS OF INTEREST

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines. The authors have no conflicts of interest to declare.

ORCID

Elise Levigoureux  <http://orcid.org/0000-0003-1231-1036>

REFERENCES

- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*. 1998;273:9443-9449.
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2005;280:9595-9603.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*. 1988;8:2804-2815.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, et al. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*. 1995;14:467-475.
- Souza JM, Giasson BI, Lee VM, Ischiropoulos H. Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett*. 2000;474:116-119.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*. 2002;22:8797-8807.
- Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC. Alpha-synuclein cooperates with C50Alfa in preventing neurodegeneration. *Cell*. 2005;123:383-396.
- Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol*. 2001;58:186-190.
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:492-501.
- Trojanowski JQ, Lee VM. Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;991:107-110.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*. 2001;294:1346-1349.
- Choi W, Zibae S, Jakes R, et al. Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett*. 2004;576:363-368.
- Lantos PL, Papp MI. Cellular pathology of multiple system atrophy: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:129-133.
- Wakabayashi K, Takahashi H. Cellular pathology in multiple system atrophy. *Neuropathology*. 2006;26:338-345.
- Yoshida M. Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration. *Neuropathology*. 2007;27:484-493.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045-2047.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998;18:106-108.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004;55:164-173.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, et al. Alpha-synuclein p. H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28:811-813.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, et al. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol*. 2013;73:459-471.
- Caudal D, Alvarsson A, Bjorklund A, Svenningsson P. Depressive-like phenotype induced by AAV-mediated overexpression of human alpha-synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neurol*. 2015;273:243-252.
- Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Transl Psychiatry*. 2016;6:e753.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002;34:521-533.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, et al. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 -> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8968-8973.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*. 2000;287:1265-1269.
- George S, van den Buuse M, San Mok S, Masters CL, Li QX, Culvenor JG. Alpha-synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. *Exp Neurol*. 2008;210:788-792.
- Oaks AW, Frankfurt M, Finkelstein DI, Sidhu A. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS ONE*. 2013;8:e60378.
- Graham DR, Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res*. 2010;88:1777-1783.
- Cacabelos R. Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics. *Int J Mol Sci*. 2017;18:551.
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med*. 2012;209:975-986.
- Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*. 2012;33:2225-2228.
- Betemps D, Verchere J, Brot S, et al. Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological alpha-synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:29.
- Levigoureux E, Lancelot S, Bouillot C, et al. Binding of the PET radiotracer [18F]BF227 does not reflect the presence of alpha-synuclein aggregates in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res*. 2014;11:955-960.
- Butler B, Sambo D, Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *J Chem Neuroanat*. 2017;83-84:41-49.
- Factor SA, McDonald WM, Goldstein FC. The role of neurotransmitters in the development of Parkinson's disease-related psychosis. *Eur J Neurol*. 2017;24:1244-1254.
- Wan OW, Shin E, Mattsson B, Caudal D, Svenningsson P, Bjorklund A. Alpha-Synuclein induced toxicity in brain stem serotonin neurons mediated by an AAV vector driven by the tryptophan hydroxylase promoter. *Sci Rep*. 2016;6:26285.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 2nd edn. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2004.
- Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:411-417.
- Akdemir UO, Tokcaer AB, Karakas A, Kapucu LO. Brain 18F-FDG PET imaging in the differential diagnosis of parkinsonism. *Clin Nucl Med*. 2014;39:e220-e226.
- Besson FL, La Joie R, Doeuve L, et al. Cognitive and brain profiles associated with current neuroimaging biomarkers of preclinical Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2015;35:10402-10411.
- Dubois A, Herard AS, Delatour B, et al. Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose

- uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroImage*. 2010;51:586-598.
42. Al-Wandi A, Ninkina N, Millership S, Williamson SJ, Jones PA, Buchman VL. Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice. *Neurobiol Aging*. 2010;31:796-804.
43. Specht CG, Schoepfer R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci*. 2001;2:11.
44. Welch A, Mingarelli M, Riedel G, Platt B. Mapping changes in mouse brain metabolism with PET/CT. *J Nucl Med*. 2013;54:1946-1953.
45. Verdurand M, Berod A, Le Bars D, Zimmer L. Effects of amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2011;32:103-114.
46. Deusser J, Schmidt S, Ettle B, Plotz S, Huber S, Muller CP, et al. Serotonergic dysfunction in the A53T alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2015;135:589-597.

How to cite this article: Levigoureux E, Bouillot C, Baron T, Zimmer L, Lancelot S. PET imaging of the influence of physiological and pathological α -synuclein on dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mouse models. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25:57-68.
<https://doi.org/10.1111/cns.12978>

Annexe 3 : sélection d'article n°3 (en page 48)

Courault P, Emery S, Bouvard S, Liger F, Chauveau F, Meyronet D, Fourier A, Billard T, Zimmer L, **Lancelot S**. Change in Expression of 5-HT6 Receptor at Different Stages of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study with the PET Radiopharmaceutical [18F]2FNQ1P. *J Alzheimers Dis.* 2020;75(4):1329-1338.

Cette étude d'autoradiographie a été réalisée sur une cohorte de tissus humains fournis par la cérébrothèque de Londres (London Neurodegenerative Diseases Brain Bank) et le Centre de Ressources Biologiques en santé humaine des Hôpitaux de Lyon (CRB-HCL) : 68 patients atteints de la maladie d'Alzheimer et sujets sains ont été comparés grâce à des coupes au niveau du noyau caudé. L'objectif était de comparer en *post mortem* la fixation du [18F]2FNQ1P à différents stades de la maladie en accord avec la nouvelle classification « ABC » validée par le NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association). Cette approche, principalement basée sur des critères anatomopathologiques, a pour la première fois séparé les paramètres cliniques des paramètres neuropathologiques dans l'algorithme diagnostique et a révolutionné la façon d'envisager la pathologie de la MA en soulignant le fait qu'une pathologie de la MA peut être présente en l'absence de MA clinique.

Il s'agit d'une des premières études associant le personnel des versants imagerie et biochimie clinique au sein de l'équipe BIORAN.

Change in Expression of 5-HT₆ Receptor at Different Stages of Alzheimer's Disease: A Postmortem Study with the PET Radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P

Pierre Courault^{a,b}, Stéphane Emery^a, Sandrine Bouvard^a, François Liger^c, Fabien Chauveau^a, David Meyronet^b, Anthony Fourier^{a,b}, Thierry Billard^{c,d}, Luc Zimmer^{a,b,c,e,*} and Sophie Lancelot^{a,b,c}

^aLyon Neuroscience Research Center (CRNL), Université de Lyon, CNRS, INSERM, Lyon, France

^bHospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France

^cCERMEP-Imaging platform, Groupement Hospitalier Est, Bron, France

^dInstitute of Chemistry and Biochemistry (ICBMS), Université de Lyon, CNRS, Villeurbanne, France

^eNational Institute for Nuclear Science and Technology (INSTN), CEA, Saclay, France

Accepted 6 April 2020

Abstract.

Background: The 5-HT₆ receptor is one of the most recently identified serotonin receptors in the central nervous system. Because of its role in memory and cognitive process, this receptor might be implicated in Alzheimer's disease (AD) and associated disorders.

Objective: The aim of this study was to investigate the binding of [¹⁸F]2FNQ1P, a new specific radiotracer of 5-HT₆ receptors, and to quantify 5-HT₆ receptor density in caudate nucleus in a population of patients with different AD stages.

Methods: Patients were classified according to the "ABC" NIA-AA classification. *In vitro* binding assays were performed in postmortem brain tissue from the healthy control (HC; *n* = 8) and severe AD ("High"; *n* = 8) groups. *In vitro* quantitative autoradiography was performed in human brain tissue (caudate nucleus) from patients with different stages of AD: HC (*n* = 15), "Low" (*n* = 18), "Int" (*n* = 20), and "High" (*n* = 15).

Results: *In vitro* binding assays did not show significant differences for the K_D and B_{max} parameters between "High" and HC groups. *In vitro* quantitative autoradiography showed a significant difference between the "High" and HC groups (*p* = 0.0025). We also showed a progressive diminution in [¹⁸F]2FNQ1P specific binding, which parallels 5-HT₆ receptors expression, according to increasing AD stage. Significant differences were observed between the HC group and all AD stages combined ("Low", "Intermediate", and "High") (*p* = 0.011).

Conclusion: This study confirms the interest of investigating the role of 5-HT₆ receptors in AD and related disorders. [¹⁸F]2FNQ1P demonstrated specific binding to 5-HT₆ receptors.

Keywords: 5-HT₆ receptor, Alzheimer's disease, caudate nucleus, [¹⁸F]2FNQ1P, specific PET radiotracer

INTRODUCTION

Serotonin is reported to have many neurological functions as a neurotransmitter, in the central nervous system but also in many other organ systems:

*Correspondence to: Luc Zimmer, CERMEP, Groupement Hospitalier Est, 59 bd Pinel, 69677 Bron cedex, France. Tel.: +33(0) 04 72 68 86 09; E-mail: zimmer@univ-lyon1.fr.

cardiovascular, pulmonary, and genitourinary [1]. Serotonin receptor studies identified 7 sub-families of serotonin receptor, with many subtypes in each [2]. The 5-HT₆ receptor is one of the most recently identified, first in rat [3,4] and then in the human brain [5]. The 5-HT receptor family is involved in many physiological processes such as memory, learning, and food intake. Many studies also demonstrated roles in pathophysiological processes, including Alzheimer's disease (AD) [6–15].

The pathophysiology of AD involves several mechanisms, from formation of extracellular amyloid- β plaques [16], to neurofibrillary tangles in the intracellular environment [17], and consecutive neuronal death and synapse loss, all leading to progressive cognitive decline [18]. While the molecule-candidates targeting aggregated proteins have so far been therapeutic failures, a new strategy has emerged in parallel, seeking to target neurotransmission systems more specifically, with the objective of improving the clinical semiology of cognitive decline. An immunohistochemistry study revealed a significant reduction in 5-HT₆ receptor density in cortical areas of AD patients [19], opening up the possibility of specific targeting of this receptor at an early stage of the disease. Several clinical studies evaluated 5-HT₆ receptor antagonists in phase I, II, or III clinical trials for the treatment of AD. Early results were mixed: a phase I study showed the antagonist PRX-07034 to be selective for 5-HT₆, improving short-term memory, while a phase II study reported no benefit of another antagonist (SAM-760) on measures of cognition and neuropsychiatric symptoms in AD patients [20]. Unfortunately, another phase III clinical trial failed, testing idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist originally developed for cognitive improvement in AD [21]. However, other 5-HT₆ receptor antagonist compounds are still being investigated [22], such as SUVN-502, currently in phase II trial [23]. Furthermore, 5-HT₆ receptor agonists have paradoxically also been shown to have cognitive enhancement properties [10], leaving this target in the race for symptomatic treatment of AD. Nevertheless, it has to be recognized that research concerning antagonists are more developed than agonists.

In this context, visualizing and quantifying 5-HT₆ receptors during the patient's lifetime through PET imaging would be a valuable contribution to understanding this therapeutic target. The development of a specific radiotracer for 5-HT₆ receptors seems necessary for better understanding of 5-HT₆ receptor

mechanisms in AD, classification of AD grades and long-term follow-up of patients treated with 5-HT₆ antagonists. Several radiotracers have been described in literature, but none stands out as specific for the 5-HT₆ receptor [24, 25]. Our laboratory recently developed a new specific radiotracer for these receptors, [¹⁸F]2FNQ1P. A previous study described the synthesis of its precursor and its radiolabeling [26]. A recent pre-clinical study in non-human primates suggested that [¹⁸F]2FNQ1P is a reliable PET radiotracer for visualization and quantification of 5-HT₆ receptors [27].

Regional distribution and associated neuronal or glial expression of 5-HT₆ receptors were investigated on human postmortem tissue by both autoradiography with [¹²⁵I]SB258585 and immunohistochemistry [28, 29]. These studies revealed high levels in the striatum, moderate levels in the hippocampus and cerebral cortex, and low levels in cerebellum.

The aim of the present study was to investigate postmortem binding of [¹⁸F]2FNQ1P in the caudate nucleus in a population of patients at different AD stages. This region, rarely explored in the context of AD [16], was chosen because of its high density of 5-HT₆ receptors, favorable for quantitative autoradiographic analyses. We hypothesized that 5-HT₆ receptor density would correlate with the stage of AD progression and severity.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and tissue samples

Adjacent unstained frozen slices (30 μ m thickness) from human caudate nuclei ($n=68$) were obtained from the London Neurodegenerative Diseases Brain Bank [30]. Sixteen fresh samples of caudate nucleus were also obtained: 10 from the 68 patients of the Medical Research Council (London) Neurodegenerative Diseases Brain Bank and 6 from the Medical Research Council (Lyon) bank (CardioBioTec, Lyon Hospitals) after approval by the hospital department review board. Patient ages, postmortem interval, and sex ratio were not significantly different ($p>0.05$) between patient groups (Table 1). Tissues were collected through appropriate consent procedures under the ethics procedures of the brain banks. Patients were stratified according to the guidelines of the National Institute on Aging-Alzheimer's Association [31]. This classification uses an "ABC" staging protocol for the

Table 1
Demographic data of patients

AD Stages	HC	Low	Int	High
Number of cases	15	18	20	15
Age (y)	83.4 ± 4.5	86 ± 4.1	87.3 ± 2.9	83.1 ± 4.2
Gender (M/F)	6/9	7/11	15/5	9/6
Postmortem interval (h)	47.1 ± 13.7	47.8 ± 8.9	51.1 ± 10.4	46.2 ± 13.9

No significant differences were observed between groups for age, sex ratio, and postmortem interval criteria ($p > 0.05$). HC, healthy control.

neuropathologic changes in AD, based on three morphologic characteristics of the disease: amyloid- β plaques (A), neurofibrillary tangles (B), and neuritic plaques (C). Using a system of scores for each group, the ABC score was transformed into four levels of AD neuropathologic alteration: HC (healthy control group), "Low", "Int" (intermediate), or "High".

For unstained frozen slices, 15 patients were in the "High" stage of AD, 20 "Int", 18 "Low", and 15 HC. For fresh caudate tissues, 8 patients were HC and 8 "High". The tissues were stored at -80°C and defrosted extemporaneously.

Radiosynthesis of the 5-HT₆ receptor radiopharmaceutical and quality controls

The chemical nitro-precursor of our 5-HT₆ PET radiotracer, [¹⁸F]2FNQ1P, was synthesized as described previously [26]. Radiolabeling with ¹⁸F was performed extemporaneously, on the days of the *in vitro* experiments, according to our published protocol [32]. Briefly, radiosynthesis used an automated Neptis fluorination module (OOC, Belgium). [¹⁸F]2FNQ1P quality control determined radiochemical purity and molar activity on analytical HPLC assay at the end of each production run, guaranteeing the radiopharmaceutical quality of the radiotracer used for the following *in vitro* experiments: i.e., molar activity > 340 GBq/ μmol and radiochemical purity > 98%.

In vitro binding assays

In vitro binding assays were performed in post-mortem fresh caudate nucleus samples from the HC and "High" groups. Briefly, tissues were preserved in phosphate buffered saline (PBS)/EDTA 0.1% and ground with buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 at 25°C) (BetaPrion, BSE Purification kit, HMOGEN TUB, biochemistry). Homogenates were centrifuged for 20 min at 35,000 g (Discovery M150 SE ultra-

centrifuge, Hitachi). The pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C) and incubated for 15 min at 37°C . Following two further centrifugation steps (as above), the membranes were finally resuspended and stored at -80°C until use.

Brain tissues were preserved in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 10 μM pargyline, 5 mM MgCl₂, 5 mM ascorbate, and 0.5 mM EDTA (pH 7.4). Binding assay consisted of 50 μL displacing compound (SB-258585 1 μM : a 5-HT₆ receptor antagonist) or buffer, 100 μL membrane suspension (corresponding to approximately 60 μg protein per well for brain tissue) and 50 μL [¹⁸F]2FNQ1P (molar activity, 59.2 GBq/ μmol). [¹⁸F]2FNQ1P was used at concentrations from 0.05 to 10 nM. Association rates were determined by incubation of membranes with radioligand at 25°C for 60 min before termination of the experiment. Bound radiolabeled tracer was separated from free tracer by filtration under reduced pressure (MultiScreen HTS-FB, Millipore). Filters were washed 6 times with 200 μL PBS. Washed filters were assayed for radioactivity by γ -counter (Gamma Wizard 2480, Perkin Elmer).

Quantitative *in vitro* 5-HT₆ receptor autoradiography

In vitro autoradiography was performed on adjacent unstained frozen slices of human brain tissue (caudate nucleus) from patients with different stages of AD. For each patient, pairs of adjacent slices were defrosted. The first slide was incubated for 60 min in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 10 μM pargyline, 5 mM MgCl₂, 5 mM ascorbate, and 0.5 mM EDTA (pH 7.4) and 18.5 kBq/mL [¹⁸F]2FNQ1P, to measure total binding, and the second was incubated in the same buffer with SB-258585 at a concentration of 100 nM, for the competition experiment to measure non-specific binding. Each slide contained two adjacent of caudate nucleus sections constituting duplicate for total and specific binding. After incubation, the slices were washed in distilled water,

then dried and placed on a phosphor imaging plate (BAS-5000, Fujifilm) for 60 min. The films were analyzed by a computer-assisted image analysis system (Multigauge, Fujifilm). For each patient, a region-of-interest (ROI) was manually drawn on one of the two sections of the slide to measure the total binding. This ROI was replicated on the other three sections (total binding and non-specific binding) to compare regions with a same size. These ROIs were positioned in homogeneous areas, avoiding folds or tissue damage due to poor sample quality, if any. The mean of total binding values and non-specific binding values (in PSM/mm²) was calculated for each slide. Specific binding was determined by subtracting non-specific binding from total binding values.

In parallel, calibration standards were prepared from rat brain tissue homogenates, as described in a previous study [33]. Briefly, crushed rat brains were homogenized, and proteins were quantified by a chemical analyzer. The rest of the homogenates was frozen at -80°C. For each radiosynthesis, four homogenates were defrosted and mixed with increasing radioligand activities (116, 231, 463, and 925 kBq). The mixture was then refrozen in isopentane

cooled with dry ice. The frozen samples were then cut into 30µm coronal slices using a -20°C cryostat. The slices were placed on the human brain slices on the imaging plates and signal-to-concentration curves were calculated.

Data analysis

ANOVA tests assessed group homogeneity for age, gender, and postmortem caudate tissue sampling interval (Table 1).

In radioligand binding studies, K_D and B_{max} values were calculated using GraphPad Prism software (Graph Pad Software, Prism 6). Statistically significant variations in radioligand binding parameters were assessed on non-parametric Mann-Whitney test. For the quantitative autoradiography study, ANOVA assessed statistical differences. In case of a difference, results were compared between groups with on *post-hoc* Bonferroni correction test. Correlations between AD stages (quantified as: HC = 0; Low = 1; Int = 2; High = 3) and specific binding were assessed on Pearson's r . For all analyses, the significance threshold was set at $p < 0.05$.

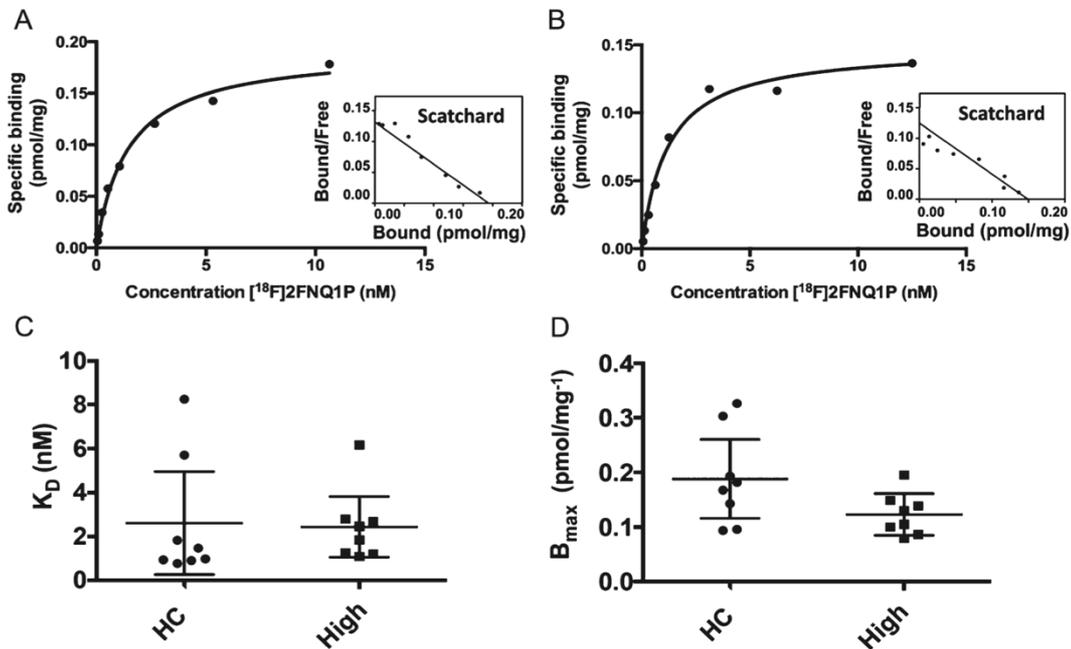


Fig. 1. *In vitro* binding assays. Example of saturation binding curves and Scatchard plots with fresh caudate nucleus samples from HC (A) and "High" AD stage (B) using the 5-HT₆ radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P. No significant differences were observed between HC and "High" groups for the dissociation constant (K_D) (C) or number of binding sites (B_{max}) (D; Mann-Whitney test, $p > 0.05$). Bars plot mean and 95% confidence interval.

RESULTS

In vitro binding assays

In vitro binding assay showed reproducible binding of [¹⁸F]2FNQ1P to 5-HT₆ receptors in the HC and “High” groups (Fig. 1A, B). Mean radioligand equilibrium dissociation constants (K_D) were 2.6 ± 2.8 nM and 2.4 ± 1.7 nM the HC group and “High” groups, respectively (Fig. 1C). Total 5-HT₆ receptor density (B_{max}) was 0.19 ± 0.09 and 0.12 ± 0.04 for the HC group and “High” groups, respectively, the difference being non-significant (Fig. 1D).

In vitro quantitative 5-HT₆ receptor autoradiography

Regardless AD stage, all samples showed binding for [¹⁸F]2FNQ1P according to the location of the 5-HT₆ receptor in the caudate nucleus. Results are presented in Fig. 2 according to AD stage. Figure 2A represents an example of the total and non-specific binding of the [¹⁸F]2FNQ1P depending on the stage of AD. Mean percentage specific binding was respectively 21.1 ± 9.7 , 16.9 ± 15.3 , 16.5 ± 12.6 , and 10.9 ± 15.4 for HC group, “Low”, “Int”, and “High” stages. Mean specific binding was respectively 96.1 ± 27.6 , 77.4 ± 41.5 , 68.4 ± 48.7 , and 39.3 ± 43.5 pmol/mg of protein for HC group, “Low”, “Int”, and “High” stages. ANOVA showed a significant difference between groups ($p=0.004$). *Post-hoc* Bonferroni correction revealed a significant difference between the “High” and HC groups ($p=0.0025$) (Fig. 2B). *Post-hoc* tests did not reveal significant differences between HC, “Low”, and “Int” groups, but specific binding showed a strong negative correlation with all stages from HC to “High” ($r=-0.42$, $p<0.01$). A significant difference ($p=0.011$) was also found between HC group and all AD stages combined (“Low”, “Int”, and “High”) on *post-hoc* *t*-test with Bonferroni correction (Fig. 2C).

DISCUSSION

To our knowledge this is the first study investigating a specific PET radiotracer of 5-HT₆ receptors in a population of AD patients with different stages of disease. The results showed a decrease in caudate 5-HT₆ receptor density with [¹⁸F]2FNQ1P in subjects with AD compared to control group.

As previously outlined, [¹⁸F]2FNQ1P is the only PET radiopharmaceutical currently available that

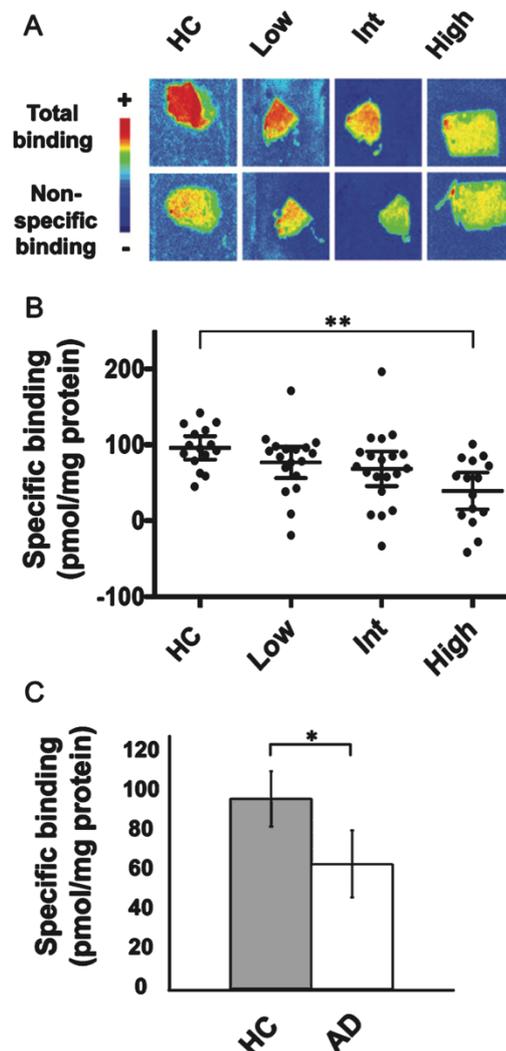


Fig. 2. Autoradiographic quantification of specific binding of the 5-HT₆ radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P according to group of patients. A) Example of regional distribution of [¹⁸F]2FNQ1P binding sites in the caudate nucleus in HC and patient groups. The autoradiographs showing the decrease of [¹⁸F]2FNQ1P binding when SB258585 is added during incubation represent non-specific binding. B) A significant difference was seen between the “High” and HC groups (** $p<0.01$). Bars plot mean and 95% confidence interval. C) A significant difference was also found between HC group and all AD stages combined (“Low”, “Int” and “High”) on *post-hoc* *t*-test with Bonferroni correction (* $p<0.05$). Error-bars with 95% confidence intervals of the means do not overlap.

is specific for 5-HT₆ receptors [32]. In addition, [¹⁸F]2FNQ1P has a high specificity for 5-HT₆ receptors with comparison to the following serotoninergic receptors, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{1B},

5-HT₄, as well as for dopamine (D₂, D₃) and muscarinic (α_{1B}) receptors, which are very present in the striatal regions [26]. In this study, binding assays showed reliable affinity of [¹⁸F]2FNQ1P for these receptors. Radioligand saturation binding assays found no significant difference between the HC and “High” groups on the K_D and the B_{max} parameters. The high affinity of [¹⁸F]2FNQ1P for 5-HT₆ was confirmed by the mean K_D for each group (around 2.5 nM). This result is consistent with a previous study which found a K_D of approximately 1 nM [26]. Although B_{max} was lower in the “High” than the HC group, the difference was non-significant. These results could be explained by the small size of the study population ($n = 8$). This explanation is frequently put forward in postmortem studies, as access to brains of neuropathologically documented AD subjects is limited. However, further investigations with a larger sample might demonstrate a significant difference, such as was found in the autoradiography assay.

Quantitative autoradiography experiments showed that [¹⁸F]2FNQ1P was suitable for visualizing and quantifying striatal 5-HT₆ receptor density. *In vitro* competition assays with the 5-HT₆ antagonist SB-258585 showed displacement of the radiotracer, confirming binding reversibility. Quantification of 5-HT₆ receptors revealed significant differences between the healthy control group (i.e., patients without AD neuropathological modifications) and patients with a high level of neuropathological modification (“High”). The results also distinguished the healthy control group from all AD stages. On the other hand, no significant differences were observed between the HC or “High” groups and other stages of AD (“Low” and “Int”). Despite these non-significant differences, the results showed a progressive decrease in the 5-HT₆ receptor expression according to AD stage, with a strong negative correlation between specific binding of [¹⁸F]2FNQ1P and disease stage. Here again, the absence of significant difference between the “High” group and earlier stages of AD can be initially explained by the relatively low number of patients in each group. Larger groups would reinforce the power of the study and could demonstrate significant differences. Another explanation concerns the complexity of assessing AD. Because of the large inter-individual variability found in AD, classification can be difficult. This is why many classifications exist, drawn up by different working groups such as the IWG-2 classification of the International Working Group for New Research Criteria for the Diagno-

sis of Alzheimer’s Disease [34] and, more recently, the “ABC” classification of the National Institute of Aging-Alzheimer’s Association (NIA-AA) [31], used in the present study. This classification considers AD as a continuum, needing to be diagnosed in its early stages. However, these criteria remain to be validated. Lowe et al. applied this classification to the Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) cohort [35]. The study showed the weakness of the NIA-AA criteria because of the complexity of interpreting biomarkers. Other studies assessing the applicability of this classification in AD patients with mild cognitive impairment showed the same weakness: variability in biomarker interpretation, lack of measurement standardization, and varying results [36, 37]. Furthermore, the “ABC” staging is strongly nested in other diseases contributing to cognitive impairment, such as Lewy body disease, vascular brain injury, or hippocampal sclerosis [38]. Thus, patient groups are difficult to distinguish, making it difficult to show significant differences between neighboring groups.

In addition, “ABC” staging is mostly based on anatomopathological criteria. The classification takes account of onset of A β or amyloid plaques, neurofibrillary tangles, and neuritic plaques, but not of clinical status. However, it is well known that anatomopathological modifications in AD correlate with disease symptomatology. Symptom onset correlates with brain atrophy [39], hypometabolism [40], and neurofibrillary changes [41]. Thus, the correlation between decreased 5-HT₆ receptor density and decrease in symptomatology could be an approach worth considering in future studies.

Another point to be taken into account in interpreting the present results concerns the polymorphism of the 5-HT₆ receptor. The human 5-HT₆ receptor protein is coded by chromosome 1 and the specific gene of the receptor contains many trinucleotide polymorphisms [5]. Some previous studies, in Chinese and Korean populations, showed an association between this polymorphism and AD, and considered this allele to be a risk factor [42, 43]. Another study, in a Caucasian population, found no significant differences between controls and AD patients [44], and considered this 5-HT₆ receptor polymorphism as a silent mutation that does not affect the function of the protein. To date, an association between 5-HT₆ polymorphism in AD patients and the binding properties of [¹⁸F]2FNQ1P is still an open question.

Although the present study is the first to visualize 5-HT₆ receptors in AD patients with a radiophar-

maceutical usable for neuroimaging *in vivo*, a few previous studies also showed a decrease in these receptors in AD and related disorders, using dedicated *in vitro* exploration probes. Lorke et al., in an immunohistochemistry study [45], reported decreased cellular expression of 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of AD patients in comparison with normal age-matched subjects. 5-HT₆ receptors were expressed in pyramidal cells and stellate-shaped cells, and AD patients showed a significant 40% decrease in 5-HT₆ receptor expression. Garcia-Alloza et al. reported similar results. They assessed the involvement of serotonergic disturbance of 5-HT₆ receptors in AD impairment. Binding assays with [¹²⁵I]SB-258585, an *in vitro* radiotracer, were performed on tissue samples from frontal and temporal cortex. Results showed a significant decrease in 5-HT₆ receptor density in both frontal (56% reduction) and temporal (58% reduction) cortex in AD patients compared to controls [19]. While these results were consistent with 5-HT₆ receptor involvement in AD, the authors did not use the clinicopathologic diagnostic classification used in the present study.

The present study also differs from a majority of previous studies in the choice of the brain region of interest: the caudate nucleus, well-known to be a region rich in 5-HT₆ receptors [46, 47]. It is known that 5-HT₆ receptors are highly and homogeneously concentrated in the caudate nucleus, putamen, and nucleus accumbens [29]. The first preclinical explorations of our radiopharmaceutical confirmed its preferential striatal binding [26, 27, 32], justifying the choice of this region for the present postmortem study. However, it must be recognized that the pathophysiological involvement of the caudate nucleus in AD is not yet well established. Brain atrophy and neuron loss occurs mainly in the frontal cortex, hippocampus, and limbic areas [48]. De Jong et al. suggested a distinction in striatal pattern morphology in AD patients compared to subjects with memory complaints without objective cognitive impairment [49]. Their study showed that cognitive impairment is related to the degree of surface deformity, hypothesizing that associative and limbic cerebral networks are primarily affected in AD. These findings highlight the interest of tracing the progression of 5-HT₆ receptors as striatal marker during neurodegeneration.

This is all the more interesting as the 5-HT₆ receptor is also a potential therapeutic target in AD [50]. Recently, drug-candidates have been developed on the pharmacological hypothesis that 5-HT₆ recep-

tor blockade induces acetylcholine release and so improves cognition processes in AD [51]. So far, clinical studies were disappointing. Idalopirdine, a 5-HT₆ receptor antagonist, did not improve cognition in patients with mild to moderate AD compared to placebo [21]; intepirdine, another selective 5-HT₆ receptor antagonist, did not show efficacy in a phase II study [52]. However, these early studies do not signify the abandonment of therapeutic targeting of 5-HT₆ receptors. Their main limitations were the lack of knowledge of 5-HT₆ receptor status in groups of heterogeneous AD patients. The difficulty of staging patients may have led to underdosing in phase III compared to phase II [53]. It is therefore crucial to have better knowledge of the progression of 5-HT₆ receptors during the course of AD, through PET imaging, to highlight potential early biomarkers, to refine the recruitment for future therapeutic trials, and, finally, to contribute to the understanding of 5-HT₆ drug-candidates by drug occupancy studies. The translational results we obtained with the radiopharmaceutical [¹⁸F]2FNQ1P therefore encourage us to implement a PET neuroimaging study in AD patients. Indeed, this *in vivo* exploration will enable us to quantify other brain regions expressing significant densities of 5-HT₆ receptors relevant to AD, such as the entorhinal, parietal, or frontal cortex, and to explore the modification of their expression during the disease progression.

CONCLUSION

This *in vitro* study is the first to demonstrate a decrease in caudate 5-HT₆ receptor density with [¹⁸F]2FNQ1P, a PET radiopharmaceutical, in subjects with AD. The challenge will now be to transfer [¹⁸F]2FNQ1P to *in vivo* PET neuroimaging studies to confirm an early decline in 5-HT₆ receptor expression during disease progression and provide better understanding of the pharmacology of future candidate molecules targeting this serotonergic receptor.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Tissues were collected through appropriate consent procedures under the ethics procedures of the brain banks. Previous consent to do experiments was given at the time of brain donation, and no supplementary consent was needed for this study. The

study was conducted according to the principles of the Helsinki and subsequent revisions.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was performed under the LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Lyon University, within the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

We particularly thank the CERMEP Imaging Platform team (Radiopharmacy-Radiochemistry Department) for technical assistance.

This study was supported by the French Alzheimer Foundation (Fondation Alzheimer, France).

Authors’ disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/19-1278r2>).

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data sets supporting the conclusions of this article can be made available upon request through the corresponding author.

REFERENCES

- [1] Roth BL (2006) *The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics*, Humana Press, Totowa, NJ.
- [2] Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1999) *Basic Neurochemistry*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- [3] Monsma FJ, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR (1993) Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* **43**, 320-327.
- [4] Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC (1993) A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: Molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 268-276.
- [5] Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW (1996) Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem* **66**, 47-56.
- [6] D. R, J. H (2001) 5-HT₆ receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **158**, 114-119.
- [7] Woolley ML, Marsden CA, Fone KCF (2004) 5-HT₆ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 59-79.
- [8] Perez-García G, Meneses A (2005) Oral administration of the 5-HT₆ receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. *Pharmacol Biochem Behav* **81**, 673-682.
- [9] Claeysen S, Bockaert J, Giannoni P (2015) Serotonin: A new hope in Alzheimer’s disease? *ACS Chem Neurosci* **6**, 940-943.
- [10] Karila D, Freret T, Bouet V, Boulouard M, Dallemagne P, Rochais C (2015) Therapeutic potential of 5-HT₆ receptor agonists. *J Med Chem* **58**, 7901-7912.
- [11] Sun B-L, Li W-W, Zhu C, Jin W-S, Zeng F, Liu Y-H, Bu X-L, Zhu J, Yao X-Q, Wang Y-J (2018) Clinical research on Alzheimer’s disease: Progress and perspectives. *Neurosci Bull* **34**, 1111-1118.
- [12] de Jong IEM, Mørk A (2017) Antagonism of the 5-HT₆ receptor - Preclinical rationale for the treatment of Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology* **125**, 50-63.
- [13] Khoury R, Grysman N, Gold J, Patel K, Grossberg GT (2018) The role of 5-HT₆-receptor antagonists in Alzheimer’s disease: An update. *Expert Opin Investig Drugs* **27**, 523-533.
- [14] Bokare AM, Bhonde M, Goel R, Nayak Y (2018) 5-HT₆ receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **235**, 1557-1570.
- [15] Shahidi S, Hashemi-Firouzi N, Asl SS, Komaki A (2019) Serotonin type 6 receptor antagonist attenuates the impairment of long-term potentiation and memory induced by Abeta. *Behav Brain Res* **364**, 205-212.
- [16] Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer’s disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383-388.
- [17] Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer’s disease. *Neurology* **42**, 631-639.
- [18] Burns A, Iliffe S (2009) Alzheimer’s disease. *BMJ* **338**, b158.
- [19] Garcia-Alloza M, Hirst WD, Chen CPL-H, Lasheras B, Francis PT, Ramirez MJ (2004) Differential involvement of 5-HT_{1B/1D} and 5-HT₆ receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer’s disease. *Neuropsychopharmacology* **29**, 410-416.
- [20] Fullerton T, Binneman B, David W, Delnomdedieu M, Kupiec J, Lockwood P, Mancuso J, Miceli J, Bell J (2018) A Phase 2 clinical trial of PF-05212377 (SAM-760) in subjects with mild to moderate Alzheimer’s disease with existing neuropsychiatric symptoms on a stable daily dose of donepezil. *Alzheimers Res Ther* **10**, 38.
- [21] Atri A, Frölich L, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, Boneva N, Windfeld K, Raket LL, Cummings JL (2018) Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease: Three randomized clinical trials. *JAMA* **319**, 130-142.
- [22] Benhamú B, Martín-Fontecha M, Vázquez-Villa H, Pardo L, López-Rodríguez ML (2014) Serotonin 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of cognitive deficiency in Alzheimer’s disease. *J Med Chem* **57**, 7160-7181.
- [23] Nirogi R, Abraham R, Benade V, Medapati RB, Jayarajan P, Bhyrapuneni G, Muddana N, Mekala VR, Subramanian R, Shinde A, Kambhampati R, Jasti V (2019) SUVN-502, a novel, potent, pure, and orally active 5-HT₆ receptor antagonist: Pharmacological, behavioral, and neurochemical characterization. *Behav Pharmacol* **30**, 16-35.
- [24] Parker CA, Gunn RN, Rabiner EA, Slifstein M, Comley R, Salinas C, Johnson CN, Jakobsen S, Houle S, Laruelle M,

- Cunningham VJ, Martarello L (2012) Radiosynthesis and characterization of ¹¹C-GSK215083 as a PET radioligand for the 5-HT₆ receptor. *J Nucl Med* **53**, 295-303.
- [25] Tang S, Verdurand M, Joseph B, Lemoine L, Daoust A, Billard T, Fournet G, Le Bars D, Zimmer L (2007) Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [¹⁸F]12ST05 as a potential 5-HT₆ PET radioligand. *Nucl Med Biol* **34**, 995-1002.
- [26] Colomb J, Becker G, Fieux S, Zimmer L, Billard T (2014) Syntheses, radiolabelings, and in vitro evaluations of fluorinated PET radioligands of 5-HT₆ serotonergic receptors. *J Med Chem* **57**, 3884-3890.
- [27] Sgambato-Faure V, Billard T, Météreau E, Duperrier S, Fieux S, Costes N, Tremblay L, Zimmer L (2017) Characterization and reliability of [¹⁸F]2FNQ1P in cynomolgus monkeys as a PET radiotracer for serotonin 5-HT₆ receptors. *Front Pharmacol* **8**, 471.
- [28] Marazziti D, Baroni S, Pirone A, Giannaccini G, Betti L, Testa G, Schmid L, Palego L, Borsini F, Bordi F, Piano I, Gargini C, Castagna M, Catena-Dell'osso M, Lucacchini A (2013) Serotonin receptor of type 6 (5-HT₆) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: An immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochem Int* **62**, 182-188.
- [29] Marazziti D, Baroni S, Pirone A, Giannaccini G, Betti L, Schmid L, Vatteroni E, Palego L, Borsini F, Bordi F, Piano I, Gargini C, Castagna M, Catena-Dell'osso M, Lucacchini A (2012) Distribution of serotonin receptor of type 6 (5-HT₆) in human brain post-mortem. A pharmacology, autoradiography and immunohistochemistry study. *Neurochem Res* **37**, 920-927.
- [30] MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank; MRC UK Brain Banks Network; <https://www.kcl.ac.uk/ioppn/depts/bcn/our-research/neurodegeneration/brain-bank>.
- [31] Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ (2012) National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **8**, 1-13.
- [32] Becker G, Colomb J, Sgambato-Faure V, Tremblay L, Billard T, Zimmer L (2015) Preclinical evaluation of [¹⁸F]2FNQ1P as the first fluorinated serotonin 5-HT₆ radioligand for PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **42**, 495-502.
- [33] Vidal B, Sebti J, Verdurand M, Fieux S, Billard T, Streichenberger N, Troakes C, Newman-Tancredi A, Zimmer L (2016) Agonist and antagonist bind differently to 5-HT_{1A} receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology* **109**, 88-95.
- [34] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R, Cappa S, Crutch S, Engelborghs S, Frisoni GB, Fox NC, Galasko D, Habert M-O, Jicha GA, Nordberg A, Pasquier F, Rabinovici G, Robert P, Rowe C, Salloway S, Sarazin M, Epelbaum S, de Souza LC, Vellas B, Visser PJ, Schneider L, Stern Y, Scheltens P, Cummings JL (2014) Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* **13**, 614-629.
- [35] Lowe VJ, Peller PJ, Weigand SD, Montoya Quintero C, Tosakulwong N, Vemuri P, Senjem ML, Jordan L, Jack CR, Knopman D, Petersen RC (2013) Application of the National Institute on Aging-Alzheimer's Association AD criteria to ADNI. *Neurology* **80**, 2130-2137.
- [36] Petersen RC, Aisen P, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, Knopman DS, Mielke M, Pankratz VS, Roberts R, Rocca WA, Weigand S, Weiner M, Wiste H, Jack CR (2013) Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease in the community. *Ann Neurol* **74**, 199-208.
- [37] Prestia A, Caroli A, Wade SK, van der Flier WM, Ossenkoppele R, Van Berckel B, Barkhof F, Teunissen CE, Wall A, Carter SF, Schöll M, Choo IH, Nordberg A, Scheltens P, Frisoni GB (2015) Prediction of AD dementia by biomarkers following the NIA-AA and IWG diagnostic criteria in MCI patients from three European memory clinics. *Alzheimers Dement* **11**, 1191-1201.
- [38] Montine TJ, Larson EB (2009) Late-life dementias: does this unyielding global challenge require a broader view? *JAMA* **302**, 2593-2594.
- [39] Desikan RS, Cabral HJ, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Weiner MW, Schmansky NJ, Greve DN, Salat DH, Buckner RL, Fischl B, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain* **132**, 2048-2057.
- [40] Jagust WJ, Landau SM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Koeppe RA, Reiman EM, Foster NL, Petersen RC, Weiner MW, Price JC, Mathis CA, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Relationships between biomarkers in aging and dementia. *Neurology* **73**, 1193-1199.
- [41] Braak H, Braak E (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* **18**, 351-357.
- [42] Tsai SJ, Liu HC, Liu TY, Wang YC, Hong CJ (1999) Association analysis of the 5-HT₆ receptor polymorphism C267T in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **276**, 138-139.
- [43] Kan R, Wang B, Zhang C, Yang Z, Ji S, Lu Z, Zheng C, Jin F, Wang L (2004) Association of the HTR6 polymorphism C267T with late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett* **372**, 27-29.
- [44] Alvarez-Alvarez M, Galdos L, Fernández-Martínez M, Gómez-Busto F, García-Centeno V, Arias-Arias C, Sánchez-Salazar C, Rodríguez-Martínez AB, Zarranz JJ, de Pancorbo MM (2003) 5-Hydroxytryptamine 6 receptor (5-HT₆) receptor and apolipoprotein E (ApoE) polymorphisms in patients with Alzheimer's disease in the Basque Country. *Neurosci Lett* **339**, 85-87.
- [45] Lorke DE, Lu G, Cho E, Yew DT (2006) Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neurosci* **7**, 36.
- [46] Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**, 1083-1152.
- [47] Filip M, Bader M (2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep PR* **61**, 761-777.
- [48] Salmon DP, Bondi MW (2009) Neuropsychological assessment of dementia. *Annu Rev Psychol* **60**, 257-282.
- [49] de Jong LW, Ferrarini L, van der Grond J, Milles JR, Reiber JHC, Westendorp RGJ, Bollen ELEM, Middelkoop HAM, van Buchem MA (2011) Shape abnormalities of the striatum in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **23**, 49-59.
- [50] Ramirez MJ, Lai MKP, Tordera RM, Francis PT (2014) Serotonergic therapies for cognitive symptoms in Alzheimer's disease: rationale and current status. *Drugs* **74**, 729-736.

- [51] Riemer C, Borroni E, Levet-Trafit B, Martin JR, Poli S, Porter RHP, Bös M (2003) Influence of the 5-HT₆ receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT₆ receptor antagonist. *J Med Chem* **46**, 1273-1276.
- [52] Maher-Edwards G, Dixon R, Hunter J, Gold M, Hopton G, Jacobs G, Hunter J, Williams P (2011) SB-742457 and donepezil in Alzheimer disease: a randomized, placebo-controlled study. *Int J Geriatr Psychiatry* **26**, 536-544.
- [53] Andrews M, Tousi B, Sabbagh MN (2018) 5HT₆ antagonists in the treatment of Alzheimer's dementia: current progress. *Neurol Ther* **7**, 51-58.

Annexe 4 : sélection d'article n°4 (en page 57)

Courault P*, **Lancelot S***, Costes N, Colom M, Le Bars D, Redoute J, Gobert F, Dailier F, Isal S, Iecker T, Newman-Tancredi A, Merida I, Zimmer L. [18F]F13640 as a PET radiopharmaceutical for functional 5-HT_{1A} receptor imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2023 Jan 19. doi: 10.1007/s00259-022-06103-1.

Cet article concernant l'étude de première administration chez l'Homme du [18F]F13640, premier agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, est l'aboutissement d'une dizaine d'années de travaux dans l'équipe. Il est également le fruit du travail complémentaire et pluridisciplinaire des personnels du CERMEP.



[¹⁸F]F13640: a selective agonist PET radiopharmaceutical for imaging functional 5-HT_{1A} receptors in humans

Pierre Courault^{1,2} · Sophie Lancelot^{1,2,3} · Nicolas Costes^{1,3} · Matthieu Colom² · Didier Le Bars^{2,3} · Jérôme Redoute³ · Florent Gobert^{1,2} · Frédéric Dailler² · Sibel Isal² · Thibaut Iecker³ · Adrian Newman-Tancredi⁴ · Inés Merida³ · Luc Zimmer^{1,2,3}

Received: 23 May 2022 / Accepted: 27 December 2022
© The Author(s) 2023

Abstract

Purpose F13640 (a.k.a. befiradol, NLX-112) is a highly selective 5-HT_{1A} receptor ligand that was selected as a PET radiopharmaceutical-candidate based on animal studies. Due to its high efficacy agonist properties, [¹⁸F]F13640 binds preferentially to functional 5-HT_{1A} receptors, which are coupled to intracellular G-proteins. Here, we characterize brain labeling of 5-HT_{1A} receptors by [¹⁸F]F13640 in humans and describe a simplified model for its quantification.

Methods PET/CT and PET-MRI scans were conducted in a total of 13 healthy male volunteers (29 ± 9 years old), with arterial input functions (AIF) (*n* = 9) and test–retest protocol (*n* = 8). Several kinetic models were compared (one tissue compartment model, two-tissue compartment model, and Logan); two models with reference region were also evaluated: simplified reference tissue model (SRTM) and the logan reference model (LREF).

Results [¹⁸F]F13640 showed high uptake values in raphe nuclei and cortical regions. SRTM and LREF models showed a very high correlation with kinetic models using AIF. As concerns test–retest parameters and the prolonged binding kinetics of [¹⁸F]F13640, better reproducibility, and reliability were found with the LREF method. Cerebellum white matter and frontal lobe white matter stand out as suitable reference regions.

Conclusion The favorable brain labeling and kinetic profile of [¹⁸F]F13640, its high receptor specificity and its high efficacy agonist properties open new perspectives for studying functionally active 5-HT_{1A} receptors, unlike previous radiopharmaceuticals that act as antagonists. [¹⁸F]F13640's kinetic properties allow injection outside of the PET scanner with delayed acquisitions, facilitating the design of innovative longitudinal protocols in neurology and psychiatry.

Trial Registration. Trial Registration EudraCT 2017–002,722–21.

Keywords [¹⁸F]F13640 · 5-HT_{1A} receptors · Functional receptor · PET imaging · Brain · Modeling study

Pierre Courault and Sophie Lancelot contributed equally to this work.

This article is part of the Topical Collection on Neurology.

✉ Luc Zimmer
luc.zimmer@univ-lyon1.fr

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, INSERM, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France

³ CERMEP, Bron, France

⁴ Neurolix, Castres, France

Published online: 19 January 2023

Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is known to have a variety of functions in the central nervous system, which are mediated by a diversity of receptors. Among them, the serotonin 1A receptor subtype (5-HT_{1A}) is a G-coupled protein receptor (GPCR) which has attracted extensive interest because it is involved in regulation of mood, cognition, pain, and movement [1]. Consequently, various positron emission tomography (PET) radiotracers have been developed to target 5-HT_{1A} receptors, including [O-methyl-¹¹C]WAY100635 [2], [carbonyl-¹¹C]WAY100635 [2, 3], and [¹⁸F]MPPF, a fluorinated derivate of WAY100635 [4, 5]. [¹⁸F]MPPF binding is observed mainly in brain regions with a high density of 5-HT_{1A} receptors such as hippocampus and raphe nuclei

[5–7] and it has been used to explore various psychiatric and neurologic diseases such as epilepsy [8], narcolepsy [9], Alzheimer's disease [10], or multiple system atrophy [11]. Other derivatives of WAY100635 have been also proposed as radiopharmaceuticals but have been less used in human [12].

Nevertheless, although [^{11}C]WAY100635 and [^{18}F]MPPF are widely used for in vivo exploration of 5-HT_{1A} receptors, PET imaging using these radiopharmaceuticals remains limited in terms of pathophysiological interpretation because of their antagonist pharmacological properties. Indeed, antagonists bind both G protein-coupled and G-protein uncoupled receptors with the same affinity, labeling the total receptor population, regardless of its functional status. In contrast, agonists have higher affinity for their target GPCRs when the latter are coupled to G-proteins, i.e., they are in a functional state which is directly associated with neurotransmission [13, 14]. Thus, we hypothesized that highly specific 5-HT_{1A} receptor agonist radiotracers would constitute useful tools to explore endogenous serotonergic neurotransmission and pathophysiological changes that specifically affect functional receptors and which would not be detectable using antagonist radiopharmaceuticals [15].

Very few 5-HT_{1A} agonists have been used as chemical templates to develop a PET radiopharmaceutical. [^{11}C]CUMI-101, which was initially presented as an agonist, was later found to act as a partial agonist or even as an antagonist [16], and it also binds to α_1 adrenoceptors [17]. These suboptimal pharmacological properties explain its modest sensitivity to pharmacological challenges or to endogenous serotonergic changes in human [18, 19]. In this context, we chose to use highly specific and pharmacologically well-characterized 5-HT_{1A} receptor agonists to develop the corresponding radiopharmaceuticals. Following several studies, we selected F13640 (a.k.a. befiradol or NLX-112), which possesses high affinity (nanomolar Ki) for 5-HT_{1A} receptors, high selectivity (> 1000-fold) over a large range of other CNS targets and whose chemical structure includes a fluorine which is substitutable by a fluorine-18. As a result, [^{18}F]F13640 was proposed as the first preclinical fluorinated 5-HT_{1A} receptor agonist radiopharmaceutical, supported by compelling preclinical data in animal models [20, 21]. Although a first image obtained in a healthy volunteer suggested favorable brain penetration by [^{18}F]F13640 [22], it remained to be demonstrated whether [^{18}F]F13640 could become a usable radiopharmaceutical for future clinical investigation. The objectives of the present study were, therefore, to perform a full PET kinetic modeling of [^{18}F]F13640 using arterial input function (AIF), to identify a reference region suitable for a simplified modeling method, and to assess reproducibility with test–retest scans. Ultimately, the present data characterizing [^{18}F]F13640 as a selective agonist radiopharmaceutical will, for the first time, enable

the investigation of changes in both 5-HT_{1A} receptor expression and functionality in patients suffering from disorders arising from dysfunctional serotonergic neurotransmission.

Material and methods

Synthesis and quality control

[^{18}F]F13640 (3-chloro-4-fluorophenyl)-[4- ^{18}F fluoro-4-[(5-methylpyridin-2-yl)methylamino]methyl]piperidin-1-yl] methanone; a.k.a. [^{18}F]NLX-112 or [^{18}F]befiradol) was synthesized as previously described [21]. Briefly, radiolabeling was obtained by a nucleophilic fluoro-substitution on the F13640 nitro precursor using an automated radiosynthesizer (Neptis, ORA). Chemical and radiochemical purity measured by HPLC was higher than 95%. Mean molar activity (EOS) was 82 ± 18 GBq/ μmol .

Study design

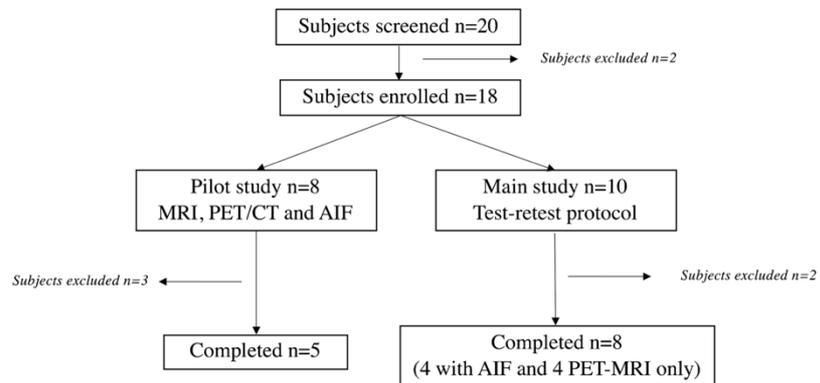
The study was performed according to the ethical standards of the institutional and national research committee and with the principles of the 1964 Declaration of Helsinki. The study was approved by a French ethics committee (Eudra-CT: 2017–002,722-21) and pre-registered on the ClinicalTrials.gov database (NCT03347331).

Participants were healthy volunteers, i.e., without neurological or psychiatric disorders, active infectious disease, severe and progressive medical pathology, without addiction (smoking, cannabis, alcohol...), or MRI and PET contraindications. Twenty volunteers were screened in the study and signed consent. Two volunteers failed inclusion due to exclusion criteria (MRI contraindication and body weight superior to 90 kg). The first eight volunteers were included in a pilot study in which the subjects underwent an anatomical MRI scan (3D T1-weighted sequence on a 1.5-T Siemens Magnetom scanner, Siemens AG, Erlanger, Germany) and a 90 min PET/CT (Siemens Biograph mCT64) scan with arterial input function (AIF, data not shown). The later 10 volunteers were included to perform a test–retest protocol with two PET-MRI scans as described below. Four participants had AIF measurements on one of the two visits. Two volunteers were lost to follow-up. To sum up, data analysis focused on four participants when concerning PET modeling with AIF and eight participants for test–retest analysis. Figure 1 summarizes recruitment of healthy subjects in the study.

PET-MRI test–retest protocol

Participants underwent a PET-MRI acquisition on the Siemens mMR Biograph system. Because the pilot study group

Fig. 1 Summary flow-chart of healthy subjects' inclusion for the pilot study and main test-retest study. Analysis focused only on the 8 PET-MRI subjects and 4 PET-MRI subjects when AIF is considering



scans showed that [^{18}F]F13640 activity curves slowly continued to vary even at later time points, suggesting that there may be further changes beyond 90 min. A PET-MRI acquisition of almost 4 h was tested to observe kinetics for a longer period. For the comfort of the subjects, the acquisition was carried out in two parts. In part 1 (PET1), list-mode PET data were acquired for 90 min directly after the injection of [^{18}F]F13640 (150 MBq + 1 MBq/kg \pm 10%) (PET1, [0; 90] min. post injection). Subjects were then taken out of the camera for a break. One hour later, for part 2 (PET2), subjects had a second PET-MRI scan for 75 min (PET2; [150; 225] min. post injection). Participants performed this PET-MRI protocol twice (test and retest sessions) 1 to 9 weeks apart.

During PET1, a 3D T1 MPRAGE MRI was acquired in sagittal orientation, with a matrix size of $256 \times 256 \times 176$ and a voxel size of 1 mm iso. TR/TE was 3300/2.45 ms, TI 1100 ms, and flip angle 8° . A quicker T1 MPRAGE MRI was acquired at the beginning of PET2 to accurately register data from the two sessions (sagittal acquisition, matrix size $256 \times 256 \times 176$, voxel size 1 mm iso, TR/TE 1800/2.34 ms, TI = 850 ms, flip angle 8°).

PET-MRI image processing

The PET data from the two parts were reconstructed independently. First, a MR-based attenuation correction map was generated from the T1 MPRAGE of each part [23]. PET1 and PET2 list modes were then corrected for motion with the EBER algorithm [24]. PET1 was rebinned into 24 frames of variable duration (8×15 s, 3×60 s, 5×120 s, 1×300 s, 7×600 s), and PET2 was rebinned into 8 frames (7×600 s, 1×300 s). Sinograms were normalized and corrected for attenuation [23], scatters, and randoms. PET reconstructions were performed with Siemens *e7tools* using the OP-OSEM algorithm with PSF, 3 iterations, and 21 subsets. A matrix size of 256 and a zoom of 3 were applied yielding a voxel

size of $0.93 \times 0.93 \times 2.03$ mm with a 4 mm 3D post-reconstruction gaussian filtering.

Both dynamic PET series from PET1 and PET2 were combined in a single dynamic series in the following way. The mean of each dynamic PET series was computed. The mean of PET2 was rigidly coregistered to the mean of PET1. This rigid transformation was applied to all frames of PET2 to obtain the PET2 frames aligned with the PET1 frames. Decay correction was applied to PET2 and PET1 setting the reference time for both series to the start time of the PET1 scan. PET1 and PET2 were finally concatenated in a single and harmonized dynamic 4D file. These preprocessing steps were performed with the *minc* toolkit functions (<http://bic-mni.github.io>).

In addition to the above, the T1 image of the retest session and the T1 image of the test session were coregistered by applying the computed rigid coregistration matrix to all images of the retest session. The structural T1 image from the test session was automatically segmented into anatomical regions using the multi-atlas propagation with enhanced registration (MAPER) method [25] and the 95-region Hammett atlas [26–28]. The raphe nucleus was segmented based on functional data from a previous study [29]. The regional segmentation was projected to test and retest sessions, and regional time activity curves (TAC) were extracted for a selection of brain regions. Regions selected for analysis were cortical regions (cingulate, frontal, occipital, parietal, temporal superior, and temporal inferior), amygdala, central grey nuclei, hippocampus, insula, parahippocampal gyrus, thalamus, brainstem, dorsal and median raphe nuclei, cerebellum (total, grey matter, and white matter), vermis, frontal lobe white matter, and corpus callosum.

Arterial input function (AIF)

Four participants underwent AIF measures during their test or retest session. AIF, free fraction, and metabolites were

measured based on 29 blood samples. Samples were collected manually after arterial catheterization with local anesthesia (lidocaine patch 5%). Sample time points were as follows: every 5 s in the first minute, every 15 s in the second minute, every 30 s in the third minute, and at time 5, 10, 20, 30, 40, 60, 75, 90, 160, and 205 min. Whole blood radioactivity was counted on every sample using a gamma counter (Perkin-Elmer) to measure the whole blood curve (Cwb). Plasma was collected and counted after centrifugation (4 min, 3000 G at 4 °C) on 18 out of 29 samples ($t = 15$ s and every sample after the first minute to calculate plasma to whole blood ratio f_{wb}). Uncorrected plasma curve (Cp) was determined by the mean f_{wb} and the whole blood curve: $Cp(t) = f_{wb} \cdot Cwb(t)$. On 5 samples ($t = 2, 10, 30, 90,$ and 205 min) free fraction and metabolites were determined. For metabolites, 500 μ L of plasma was added to 750 μ L of acetonitrile with cold carrier of F13640 at 20 mg/L, centrifuged (4 min, 3000 G at 4 °C), filtered at 0.45 μ m, diluted with water, and injected in a C8 HPLC column with a mixed mobile phase water/acetonitrile/TFA (60/40/0.1). Metabolites and [18 F]F13640 were separated, and fractions were collected and counted in the gamma counter. The activity of the [18 F]F13640 fraction was divided by the total activity recovered from the gamma counter to give the plasma parent fraction of unmetabolized [18 F]F13640 (PPf). For plasma free fraction (fp), 1 mL of plasma was centrifugated (Centrifree®, Millipore) for 20 min, 2000 g at 20–25 °C, and 100 μ L of ultrafiltrate plasma was counted in a gamma counter. After counting, all samples were weighed, and counts were corrected. The fp was calculated from the ratio of concentrations in the ultrafiltrate and whole plasma. The AIF was derived from $Cp(t)$ according to: $AIF(t) = PPf(t) \cdot Cp(t) \cdot fp(t)$.

Kinetic modeling

Cerebral TACs ($PET(t)$) were modeled with three different AIF models for participants who performed AIF ($n = 4$): one-tissue compartment (1TC), two-tissue compartment (2TC), and the Logan graphical method (LOGAN) [30]. Blood volume in tissue (V_b) was included as a model parameter in the operational equation according to: $PET(t) = V_b \cdot Cwb(t) \cdot x + (1 - V_b) \cdot C_T(t)$, where C_T is the TAC in tissue. Model fit accuracies were compared using the Akaike Information Criterion (AIC). Two models with reference region were also assessed: the Simplified Reference Tissue Model (SRTM) [31] and the logan reference model (LREF) [30]. Four different reference regions were compared: corpus callosum (CC), cerebellum (CER), white matter cerebellum (CERWM), and frontal lobe white matter (FLWM). Distribution volume ratio (DVR) for models with AIF (DVR_{1TC} or DVR_{2TC}) was calculated as the ratio between the V_t of the region of interest and the V_t of the reference region. DVRs

for SRTM (DVR_{SRTM}) were calculated by adding one to the binding potential (BP) value. DVRs calculated with AIF models were compared to DVRs obtained with reference region models using linear regression to determine fitting parameters: intercept, slope, and determination coefficient (R^2). Kinetic modeling was done using the Turku PET center utilities library (TPCCLIB, <https://gitlab.utu.fi/vesoik/tpcclib>).

Test–retest reproducibility and reliability

For all the participants in the test–retest study ($n = 8$), models with reference region were applied on both sessions. Bias and variability (VAR) were calculated to assess reproducibility, and the intraclass correlation coefficient (ICC) was computed to estimate reliability. Bias was calculated as $(DVR_{retest} - DVR_{test}) / DVR_{test} \times 100$ and VAR as the standard deviation (SD) of the bias. Parameters were expressed as percentage. ICC was calculated as $(BSMSS - WSMSS) / (BSMSS + WSMSS)$ where the BSMSS is the mean sum of the square between subjects and WSMSS is the mean sum of the square within subjects [32].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using RStudio (RStudio Team 2020, <http://www.rstudio.com/>). Paired Student's t -tests were used to assess differences between injected doses and molar activities between test and retest sessions. Significant threshold was set at $p < 0.05$.

Results

Subject demographics

Mean age of the participants was 29 ± 9 years in the test–retest study. No significant differences were found in the activity of the [18 F]F13640 doses administered to the subjects or in the molar activities of [18 F]F13640 between the test and retest (p value > 0.05). Due to an injection error, participant 8 received a dose of [18 F]F13640 for a retest session that was slightly lower than the recommended dosages described in the study. Details are presented in Table 1.

Modeling study

Mean plasma parent fractions were $99.40\% \pm 0.00\%$, $97.40\% \pm 0.01\%$, $96.20\% \pm 0.01\%$, $95.40\% \pm 0.01\%$, and $95.30\% \pm 0.01\%$ at 2, 10, 30, 90, and 205 min respectively after injection. One value was discarded for participant 2 at 90 min due to non-interpretable value. Mean plasma parent fraction was modeled with a one-exponential function:

Table 1 Age, injected dose, and molar activity per subject and test and retest session. No significant differences were found between test and retest sessions for injected dose and molar activity (both p value > 0.05)

Subject	Test session			Retest session	
	Age	Activity injected (MBq)	Molar activity (GBq/ μ mol)	Activity injected (MBq)	Molar activity (GBq/ μ mol)
1	25	211	75	214	79
2	28	213	71	219	83
3	23	213	75	224	108
4	23	210	78	227	76
5	45	232	72	257	126
6	21	210	87	222	81
7	42	226	75	243	105
8	27	243	124	188	76
Mean \pm SD	29 \pm 9	220 \pm 12	82 \pm 18	224 \pm 20	92 \pm 19

$$PPf(t) = 1 - A_0 \cdot (1 - e^{(-\ln(2) \cdot \frac{t}{T})})$$

with $A_0 = 0.046$ and $T = 9.06$ min

Free plasmatic fraction was not constant over time and mean values were $0.48\% \pm 0.09\%$, $0.82\% \pm 0.08\%$, $1.14\% \pm 0.26\%$, $1.90\% \pm 0.71\%$ and $1.61\% \pm 0.29\%$ at 2, 10, 30, 90, and 205 min. Ratio plasma to whole blood was stable over time and mean value was 1.79 ± 0.03 . Table 2 summarizes the pharmacokinetic parameters for each subject. Figure 2 shows an example of AIF corrected for metabolites, whole blood, and uncorrected plasma curves. Individual TACs and AIF are presented in online resource 1 (Fig S1, S2, S3, and S4).

Mean AIC using the one-tissue compartment model (1TC) was 320.88 ± 13.66 and 291.92 ± 25.46 for the two-tissue compartment model (2TC). Two-tissue compartment model better fits with the pharmacokinetic of [^{18}F]F13640 when comparing the AIC but results in nonsensical numerical kinetics parameters (k_3 and k_4). Thus, the 1TC model was considered as the reference model for the results presented below. Fitted curves for 1TC and 2TC modeling are presented in online resource 1 (Fig S5 and S6).

Pharmacokinetic parameters for the 1TC model are presented in Table 3. The highest V_t values were found in raphe nuclei (median and dorsal), cingulate, amygdala, and insula. The lowest V_t values were in cerebellum white matter, frontal lobe white matter, and corpus callosum, all tested as reference regions. The cerebellum (grey + white matter), also tested as a reference region, showed intermediate V_t values.

Linear regressions of DVR_{LREF} and DVR_{SRTM} , compared to DVR_{1TC} with the four reference regions tested, are presented in Table 4. For LREF model, all coefficients of determination (R^2) were very high (> 0.9). Best fitting was obtained with $\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$ and LREF_{CER} (0.95 ± 0.03 both). Note that both LREF_{CC} and $\text{LREF}_{\text{FLWM}}$ showed high R^2 values (0.94 ± 0.03 and 0.94 ± 0.04 , respectively). Intercept

ranged from 0.01 ± 0.05 (LREF_{CER}) to 0.04 ± 0.08 (LREF_{CC}) thus best fitting (closest to 0) was obtained with LREF_{CER} . Slopes ranged from 0.93 ± 0.02 (LREF_{CC}) to 1.01 ± 0.03 ($\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$) and the best slope value was found with $\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$ (1.01 ± 0.02). For the SRTM model, regression parameters (R^2) were slightly lower than those found with LREF but close to 0.9, except for CC which showed the lowest R^2 value (0.59 ± 0.10). Intercepts ranged from 0.04 ± 0.09 for SRTM_{CER} (best fitting) to 0.68 ± 0.12 for SRTM_{CC} . Slopes ranged from 0.67 ± 0.13 (SRTM_{CC}) to 0.93 ± 0.13 (SRTM_{CER}). $\text{SRTM}_{\text{CERWWM}}$ and $\text{SRTM}_{\text{FLWM}}$ showed acceptable slopes with 0.92 ± 0.09 and 0.91 ± 0.10 , respectively.

Parametric images were obtained using models with reference region. As an example, Fig. 3 shows a brain parametric image of binding potential (BP) using the LREF modeling method with CERWWM as reference region.

Test–retest reproducibility and reliability

Test–retest study results are presented in Table 4. Reproducibility was high for the LREF method and satisfying for SRTM. Biases were similar between modeling methods and between reference regions. Results ranged from -1.48 to 0.95% with the lowest bias for $\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$ (-0.04%). As concerns variability (VAR), results were more disparate between methods. The LREF method showed a very low variability of less than 3% for all reference regions. The lowest VAR was found for $\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$ with 2.41%. VAR values for other reference regions were also very low with 2.55%, 2.81%, and 2.84% for $\text{LREF}_{\text{FLWM}}$, LREF_{CER} , LREF_{CC} , respectively. SRTM showed higher values. The lowest VAR was SRTM_{CER} with 7.16%. Variability for $\text{SRTM}_{\text{CERWWM}}$ and $\text{SRTM}_{\text{FLWM}}$ was also satisfying with 8.76% and 8.51%, respectively. Reliability showed better results for the LREF method than with SRTM, with all ICC around 0.9 and the best performance for $\text{LREF}_{\text{CERWWM}}$ (0.95 ± 0.04). The STRM method showed ICC values

Table 2 Details of pharmacokinetics parameters per subject. Plasma parent fraction and free plasma fraction results are expressed as a function of time. Plasma to whole blood was stable over time and results are expressed as a mean value across the sessions for each participant

Parameter	Plasma parent fraction (%)				Free plasma fraction (%)				Plasma to whole blood ratio				
	2	10	30	90	205	2	10	30	90	205	Mean value \pm SD		
Time (min)													
Subject													
2	99.5	96.1	95.4	NA	96.7	0.42	0.72	1.10	1.23	1.94	1.84 \pm 0.11		
5	99.5	97.9	97.8	96.7	95.6	0.52	0.79	0.88	2.87	1.66	1.78 \pm 0.11		
7	98.9	97.5	95.8	94.9	94.7	0.38	0.88	1.08	1.56	1.62	1.77 \pm 0.14		
8	99.5	98.0	95.6	94.5	94.3	0.59	0.89	1.51	1.94	1.24	1.77 \pm 0.14		
Mean \pm SD	99.40 \pm 0.00	97.40 \pm 0.01	96.20 \pm 0.01	95.40 \pm 0.01	95.30 \pm 0.01	0.48 \pm 0.09	0.82 \pm 0.08	1.14 \pm 0.26	1.90 \pm 0.71	1.61 \pm 0.29	1.79 \pm 0.03		

that were lower and with spread over a wider range from 0.47 ± 0.31 for $SRTM_{FLWM}$ to 0.75 ± 0.26 for $SRTM_{CER}$. ICCs for $SRTM_{CERWM}$ and $SRTM_{CC}$ were intermediate with 0.63 ± 0.23 and 0.67 ± 0.17 , respectively.

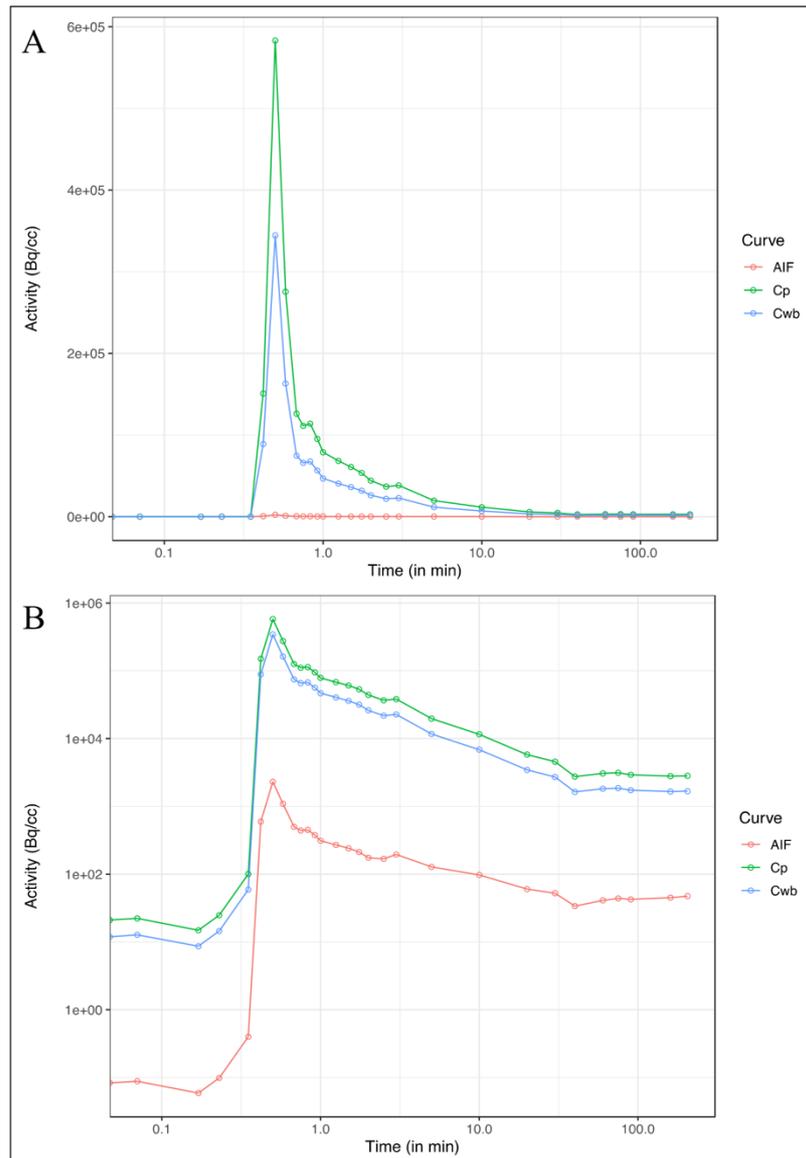
Table 5 summarizes reproducibility and reliability parameters in each region for $SRTM_{CERWM}$ and $LREF_{CERWM}$. DVR was highly correlated between test and retest whatever the method used ($R^2 > 0.99$ for $LREF_{CERWM}$ and $R^2 > 0.98$ for $SRTM_{CERWM}$). ICC, bias, and VAR per region confirmed the results described in Table 4 and showed that the overall best parameters were those observed using the $LREF_{CERWM}$ method.

Considering $LREF_{CERWM}$, bias was consistently low, between -1 and 1% , for all regions. Only the median raphe nucleus showed bias outside this range (-1.27%). Variability was very low for all regions, with values around or less than 3% , except for the median raphe nucleus (6.62%). Reliability was high (> 0.7) for all regions. Considering $SRTM_{CERWM}$, biases were all satisfying, with higher values observed for the frontal cortex (-4.33%) and hippocampus (3.11%). For variability, the median raphe nucleus showed the highest value (20.03%). The temporal (superior and inferior), occipital, parietal cortex, and corpus callosum showed VAR higher than 10% . Other regions showed variability of less than 10% . Reliability was low for the median raphe nucleus (-0.07), cerebellum (0.33), and cerebellum grey matter ($CERGM = 0.35$). Some regions showed particularly high reliability with ICC values above 0.7 , such as the cingulate (0.74) and frontal cortex (0.86), and the highest ICC value was found for the parahippocampal gyrus (0.95). Other regions showed intermediate ICC from 0.5 to 0.7 such as the hippocampus (0.62) and amygdala (0.65).

Discussion

In this study, we describe the first-in-human trial of a new PET radiopharmaceutical [^{18}F]F13640 which, thanks to its agonist properties, permits in vivo imaging of functional human $5-HT_{1A}$ receptors. Several analyses were carried out: (i) full kinetic modeling of the radiopharmaceutical using dynamic scans and arterial blood sampling; (ii) comparison of four different reference regions and evaluation of two simplified modeling methods to measure binding potential values and obtain parametric images; and (iii) assessment of test-retest reliability for simplified models. The main finding is that [^{18}F]F13640 constitutes a $5-HT_{1A}$ receptor radiopharmaceutical with favorable brain binding properties, and the present study describes a PET acquisition protocol and a quantification method suitable for the clinical study of functional $5-HT_{1A}$ receptors in neurology and psychiatry.

Fig. 2 Example of an arterial input function (AIF) for a subject with whole blood (Cwb) and uncorrected plasma curve (Cp). **A** Logarithmic time scale. **B** Double-logarithmic scale for the same subject



Study design

Initial tests used a protocol with 90 min PET/CT scans and AIF for study participants. However, preliminary analyses of the 5 first subjects revealed a slow washout from cerebral tissues of the radiopharmaceutical, a characteristic that has also been observed for some other radiopharmaceuticals, such as [^{18}F]fallypride [33]. This observation is in accordance with our preclinical observations in rat, cat,

and macaque [21]. Since [^{18}F]F13640 has a high affinity for the target sites, the low tissue clearance k_2 observed on kinetics could be interpreted as a very low dissociation rate on 5-HT $_{1A}$ receptors. On the basis of these preliminary observations, we concluded that kinetic modeling of the tracer and parameters identification would require a longer acquisition protocol, which was then implemented for the main study. A 165-min long PET acquisition was implemented with a first scan lasting 90 min and a second

Table 3 One-tissue compartment model parameters for 4 subjects (Vt: total volume distribution, Vb: blood volume). Data are presented as mean \pm SD

Regions	K1 (mL/(min*mL))	k2 (min ⁻¹)	Vt (mL/mL)	Vb (%)
<i>Cortical region</i>				
Cingulate lobe	1.38 \pm 0.31	0.014 \pm 0.004	98.4 \pm 19.6	3.8 \pm 0.4
Frontal lobe	1.33 \pm 0.24	0.016 \pm 0.004	86.9 \pm 19.4	3.3 \pm 0.3
Occipital lobe	1.26 \pm 0.28	0.017 \pm 0.004	77.9 \pm 17.5	3.6 \pm 0.4
Parietal lobe	1.32 \pm 0.33	0.016 \pm 0.004	83.6 \pm 19.4	3.8 \pm 0.3
Temporal superior lobe	1.31 \pm 0.29	0.016 \pm 0.004	85.5 \pm 20.7	4.0 \pm 0.8
Temporal inferior lobe	1.19 \pm 0.29	0.016 \pm 0.004	78.2 \pm 20.0	2.9 \pm 0.4
<i>Subcortical region</i>				
Amygdala	1.07 \pm 0.22	0.013 \pm 0.003	87.8 \pm 20.2	3.6 \pm 0.6
Central grey nuclei	1.07 \pm 0.27	0.016 \pm 0.004	71.3 \pm 18.5	3.0 \pm 0.5
Hippocampus	1.04 \pm 0.25	0.013 \pm 0.003	83.3 \pm 19.8	3.5 \pm 0.6
Insula	1.18 \pm 0.26	0.014 \pm 0.004	88.1 \pm 21.3	3.7 \pm 0.4
Parahippocampal gyrus	1.05 \pm 0.21	0.014 \pm 0.004	75.8 \pm 15.9	4.4 \pm 0.8
Thalamus	1.18 \pm 0.28	0.015 \pm 0.004	84.4 \pm 21.6	3.8 \pm 0.3
<i>Brainstem</i>				
Brainstem	1.03 \pm 0.26	0.013 \pm 0.003	81.6 \pm 21.6	3.3 \pm 0.4
Dorsal raphe nucleus	1.21 \pm 0.33	0.013 \pm 0.004	96.6 \pm 28.4	3.3 \pm 0.5
Median raphe nucleus	1.13 \pm 0.31	0.012 \pm 0.003	93.8 \pm 26.0	3.2 \pm 0.5
<i>Cerebellum</i>				
Cerebellum	1.38 \pm 0.37	0.016 \pm 0.004	86.6 \pm 20.4	4.2 \pm 0.4
Cerebellum grey matter	1.38 \pm 0.41	0.016 \pm 0.004	86.6 \pm 22.0	4.1 \pm 0.4
Cerebellum white matter	1.03 \pm 0.25	0.015 \pm 0.003	68.7 \pm 16.9	2.8 \pm 0.3
Vermis	1.41 \pm 0.40	0.017 \pm 0.004	86.7 \pm 22.0	3.9 \pm 0.4
<i>Reference region</i>				
Frontal lobe white matter	0.81 \pm 0.16	0.013 \pm 0.004	63.3 \pm 13.7	2.0 \pm 0.3
Corpus callosum	0.56 \pm 0.11	0.011 \pm 0.003	49.8 \pm 9.9	2.2 \pm 0.4

Table 4 Regression parameter of DVR_{SRTM} and DVR_{LREF} compared to DVR_{ITC} for 4 subjects with AIF. Test–retest parameters for reproducibility assessment in 8 healthy subjects. Reference region tested were corpus callosum (CC), cerebellum (CER), cerebellum white

matter (CERWM), and frontal lobe white matter (FLWM). Data are presented as mean \pm SD. ICC=interclass correlation coefficient, VAR=variability

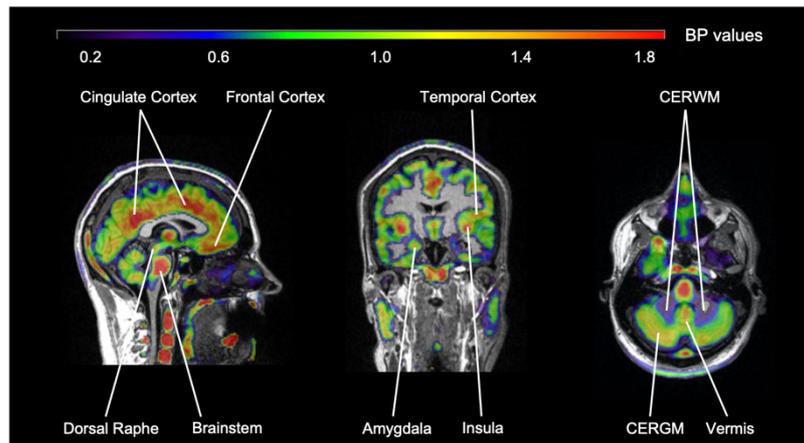
Model	Mean regression parameter compared to DVR _{ITC}				Mean test–retest parameters		
	Reference Region	Slope	Intercept	R ²	ICC	Bias (%)	VAR (%)
DVR _{LREF}	CC	0.93 \pm 0.02	0.04 \pm 0.08	0.94 \pm 0.03	0.89 \pm 0.10	0.95	2.84
	CER	1.01 \pm 0.03	0.01 \pm 0.05	0.95 \pm 0.03	0.93 \pm 0.13	-0.27	2.81
	CERWM	1.01 \pm 0.02	0.02 \pm 0.06	0.95 \pm 0.03	0.95 \pm 0.04	-0.04	2.41
	FLWM	0.97 \pm 0.03	0.03 \pm 0.08	0.94 \pm 0.04	0.88 \pm 0.08	0.24	2.55
DVR _{SRTM}	CC	0.67 \pm 0.13	0.68 \pm 0.12	0.59 \pm 0.10	0.67 \pm 0.17	0.23	11.34
	CER	0.93 \pm 0.13	0.04 \pm 0.09	0.90 \pm 0.03	0.75 \pm 0.26	-0.55	7.16
	CERWM	0.92 \pm 0.09	0.10 \pm 0.06	0.89 \pm 0.03	0.63 \pm 0.23	-1.48	8.76
	FLWM	0.91 \pm 0.10	0.14 \pm 0.09	0.90 \pm 0.10	0.47 \pm 0.31	0.34	8.51

one lasting 75 min, separated by a 1-h break outside of the camera. This longer protocol with two acquisition periods was facilitated using a hybrid PET-MR scanner, which is capable of brain anatomical realignment and motion correction between PET acquisitions.

Modeling study

Our data revealed that the pharmacokinetic parameters of [¹⁸F]F13640 were similar to those found with F13640 (i.e., NLX-112, befiradol) at pharmacological doses. Thus, the

Fig. 3 Parametric image of BP values estimated with $LREF_{CERWM}$. BP image is overlaid on the T1 MRI of the participant (CERWM = cerebellum white matter; CERGM = cerebellum grey matter)



fraction of [^{18}F]F13640 parent compound remained high (95%) in blood at 30 to 205 min after injection, consistent with observations on unlabeled NLX-112 in healthy volunteers (Neurolix, data on file). The ratio of [^{18}F]F13640 binding in plasma to whole blood showed favorable results with a higher distribution in plasma (1.79 ± 0.03). Also, the fp of about 2% was similar between NLX-112 and [^{18}F]F13640. However, we observed unreasonably high K_1 values since they were higher than cerebral blood flow investigated with [^{15}O]H $_2$ O PET [1, 2]. A plausible, but not a necessarily unique explanation, is that fp measurement has a highly variable value in the first few minutes, and stabilizes later towards a very low value. Processing of the blood samples required 20 to 25 min before being measured for protein binding, and thus may not represent the “true” fp at an early time of acquisition. Therefore, K_1 estimates are prone to inaccuracy since fp may not have reached its low equilibrium at short time points after injection. Based on this observation, we also performed 1TC modeling using only mean late-time fp value since they were considered to be more reliable and in accordance with data generated using unlabeled F13640 (Neurolix, data on file). As expected, this modeling study showed more realistic values (see table S1 in online resource). It should be noted that the calculation of K_1 does not constitute an obstacle for use of [^{18}F]F13640 because data generated using this radiopharmaceutical is intended to be analyzed with a simplified method or under static scans with reference region and thus will not require fp value.

A crucial step in the validation of a new brain receptor radiopharmaceutical is the validation of a reference region. Based on literature describing regions poor in 5-HT $_{1A}$ receptors, we tested four different reference regions: corpus callosum (CC), cerebellum (CER), cerebellum white matter (CERWM), and frontal lobe white matter (FLWM). We tested their accuracy and reproducibility performance with

two simplified modeling methods, the LREF and SRTM. For the validation with a gold standard, very favorable correlations have been found with the LREF model compared to the 1TC AIF, whatever the reference region. The SRTM method also showed satisfying results in regression whereas compared to 1TC AIF model, except for CC as reference, showed the weakest results. For test–retest reproducibility, ICC, bias, and variability were similar for LREF with the four reference regions, with superior performance when using CERWM as reference region. With SRTM methods, performance for reliability is more mixed, with a clear superiority for the CERWM reference region. Some assumptions need to be validated for the use of SRTM: reference region has no specific binding, the K_1/k_2 parameter needs to be the same in the reference region, and regions of interest and kinetics can be fitted with the 1TC model. All these assumptions were confirmed with [^{18}F]F13640 since CERWM is known to have very low 5-HT $_{1A}$ receptors expression [35], the K_1/k_2 parameter was similar between CERWM and regions of interest such as hippocampus or cingulate, and CERWM was fitted with the 1TC model. Taken together, these results indicate that CERWM is the best reference region, showing a low binding, a high correlation with the AIF model, and favorable test–retest reproducibility. Both the LREF and SRTM methods showed similar binding values for all brain regions. Using the SRTM method, the amygdala and hippocampus showed high BP while LREF-calculated BP values were intermediate. According to the 1TC model, the binding values of the amygdala and hippocampus calculated with SRTM are more accurate than the one with LREF. However, considering test–retest parameters, better reproducibility and reliability were found with the LREF method. The high level of test–retest reliability is confirmed at the regional level for LREF with the CERWM, something which is not systematically the case for SRTM and CERWM.

Table 5 Reliability and reproducibility parameters between test and retest per region for Logan graphical method (LREF) and Simplified Reference Tissue Model (SRTM) using white matter cerebellum as reference region (CERWM). Parameters calculated were interclass correlation coefficient (ICC), variability (VAR), and bias. DVRs are expressed as mean \pm SD. (CERGM = cerebellum grey matter; FLWM = frontal lobe white matter)

Model	Region	DVR test	DVR retest	ICC	Bias (%)	VAR (%)
LREF _{CERWM}	<i>Cortical region</i>					
	Cingulate	1.38 \pm 0.11	1.37 \pm 0.10	0.97	0.31	1.78
	Frontal	1.28 \pm 0.09	1.28 \pm 0.09	0.97	0.54	1.80
	Occipital	1.06 \pm 0.10	1.06 \pm 0.09	0.99	-0.24	1.64
	Parietal	1.20 \pm 0.10	1.20 \pm 0.09	0.97	-0.30	2.16
	Temporal inferior	1.15 \pm 0.10	1.15 \pm 0.09	0.92	-0.01	3.42
	Temporal superior	1.24 \pm 0.09	1.24 \pm 0.09	0.93	-0.19	2.95
	<i>Subcortical region</i>					
	Amygdala	1.20 \pm 0.07	1.19 \pm 0.06	0.90	0.07	2.28
	Central grey nuclei	1.03 \pm 0.16	1.03 \pm 0.15	0.94	0.38	2.30
	Hippocampus	1.15 \pm 0.07	1.15 \pm 0.06	0.92	-0.37	2.10
	Insula	1.22 \pm 0.08	1.21 \pm 0.08	0.94	0.55	2.42
	Parahippocampal gyrus	1.08 \pm 0.08	1.09 \pm 0.07	0.95	-0.79	2.47
	Thalamus	1.16 \pm 0.09	1.15 \pm 0.08	0.99	0.48	1.20
	<i>Brainstem</i>					
	Brainstem	1.12 \pm 0.09	1.12 \pm 0.08	0.99	0.25	1.09
	Dorsal raphe nucleus	1.33 \pm 0.12	1.33 \pm 0.11	0.94	0.25	3.12
	Median raphe nucleus	1.26 \pm 0.12	1.27 \pm 0.14	0.81	-1.27	6.62
	<i>Cerebellum</i>					
	Cerebellum	1.31 \pm 0.07	1.31 \pm 0.07	0.96	0.23	1.50
	CERGM	1.31 \pm 0.07	1.31 \pm 0.07	0.96	0.23	1.50
	Vermis	1.32 \pm 0.07	1.32 \pm 0.07	0.98	0.20	0.92
	<i>Reference region</i>					
FLWM	0.89 \pm 0.06	0.89 \pm 0.05	0.97	-0.31	1.66	
Corpus callosum	0.68 \pm 0.06	0.68 \pm 0.04	0.92	-0.93	2.84	
SRTM _{CERWM}	<i>Cortical region</i>					
	Cingulate	1.36 \pm 0.15	1.40 \pm 0.14	0.74	-3.04	7.09
	Frontal	1.18 \pm 0.16	1.23 \pm 0.15	0.86	-4.33	6.26
	Occipital	0.97 \pm 0.13	0.99 \pm 0.13	0.69	-1.49	11.95
	Parietal	1.11 \pm 0.14	1.13 \pm 0.12	0.70	-2.36	10.28
	Temporal inferior	1.09 \pm 0.17	1.11 \pm 0.10	0.62	-2.72	11.15
	Temporal superior	1.18 \pm 0.19	1.21 \pm 0.13	0.48	-3.04	14.74
	<i>Subcortical region</i>					
	Amygdala	1.30 \pm 0.14	1.30 \pm 0.12	0.65	0.08	7.90
	Central grey nuclei	0.99 \pm 0.18	1.01 \pm 0.17	0.77	-1.96	6.84
	Hippocampus	1.24 \pm 0.11	1.20 \pm 0.12	0.62	3.11	7.34
	Insula	1.24 \pm 0.15	1.26 \pm 0.14	0.73	-1.58	8.55
	Parahippocampal gyrus	1.08 \pm 0.08	1.08 \pm 0.07	0.95	0.18	2.49
	Thalamus	1.15 \pm 0.15	1.16 \pm 0.12	0.79	-1.50	7.75
	<i>Brainstem</i>					
	Brainstem	1.21 \pm 0.13	1.21 \pm 0.15	0.88	0.30	6.54
	Dorsal raphe nucleus	1.41 \pm 0.11	1.42 \pm 0.17	0.55	-0.69	9.70
	Median raphe nucleus	1.36 \pm 0.21	1.39 \pm 0.18	-0.07	-2.23	20.03
	<i>Cerebellum</i>					
	Cerebellum	1.25 \pm 0.07	1.26 \pm 0.06	0.33	-0.93	5.60
	CERGM	1.25 \pm 0.06	1.27 \pm 0.05	0.35	-1.83	5.17
	Vermis	1.23 \pm 0.07	1.24 \pm 0.08	0.74	-1.12	4.46
	<i>Reference region</i>					
Corpus callosum	0.77 \pm 0.11	0.80 \pm 0.08	0.63	-2.97	10.65	
FLWM	0.90 \pm 0.07	0.92 \pm 0.10	0.58	-2.92	7.61	

Overall, these results lead us to favor the LREF model with CERWM as reference region for future studies comparing patients to healthy volunteers or patients at different times. The low variability and high reliability ($ICC > 0.7$) of the LREF model with CERWM as reference region guarantee the power of future studies and the capacity to detect differences between groups due to pathological changes rather than inter-participant or protocol variability. However, the SRTM modeling method and FLWM as an alternative reference region are not to be totally discarded. Indeed, the choice of the modeling method and of the reference region will be driven by the pathology in the study. As an example, cerebellar atrophy could be a confounding factor when using CERWM as a reference region and FLWM would be a suitable alternative. In the present study, the LREF method with CERWM as reference region was used to evaluate [^{18}F]F13640 binding patterns, as discussed below.

Finally, modeling was also computed with the first 90 min (online resource 1 Fig S7). Correlations of V_t by subject, evaluated with 90 min versus 225 min were acceptable but somewhat lower than for shorter scans (R^2 between 0.55 to 0.75), with a slight bias (slopes between 0.66 and 1.05) and small intercepts (0.22–0.61). Performing scans of 90 min are therefore feasible but not optimal for an accurate evaluation of the binding potential.

[^{18}F]F13640 brain binding patterns

[^{18}F]F13640 showed elevated BP values in regions known to express a high density of 5-HT_{1A} receptors, including the raphe (median and dorsal) and cortical regions (cingulate, frontal, and temporal superior) [36]. It is noteworthy that the hippocampus only showed intermediate uptake of [^{18}F]F13640 with moderate BP values. Median and dorsal raphe nuclei were regions with the highest BP values but also with the most substantial variability. This can be explained by the fact that the raphe nucleus is the only region that is not defined on the basis of anatomical data but by functional data [29]. Note that some vessels showed also high binding value and could affect the BP of the nearest regions due to a partial volume effect.

[^{18}F]F13640 binding in cerebellum grey matter

As described above, cerebellum grey matter and vermis both showed high BP values. Whereas a high expression of 5-HT_{1A} receptors has been described in vermis [35, 37], it is frequently postulated that cerebellum grey matter does not express 5-HT_{1A} receptors. Indeed, according to post-mortem autoradiographic studies [38, 39], 5-HT_{1A} receptors are expressed in fetal and neonatal stages but not in adults [40]. The present unexpected binding of [^{18}F]F13640 in the cerebellum could thus question its target specificity, but

an interaction by the radiotracer with a possible off-target seems unlikely based on well-documented *in vitro* studies on F13640 [20]. Moreover, our previous preclinical studies also detected [^{18}F]F13640 binding in the cerebellum in different species [21, 22] and, in all these studies, co-administration of pharmacologically relevant doses of a 5-HT_{1A} receptor agonist (8-OH-DPAT) or of an antagonist (WAY-100635) inhibited [^{18}F]F13640 binding, indicating that its binding in cerebellum grey matter specifically reflects 5-HT_{1A} receptor expression in this region. In addition to the present data with [^{18}F]F13640, the assumption of a total lack of 5-HT_{1A} receptors in the cerebellum was already challenged by previous PET studies revealing [*carbonyl*- ^{11}C]WAY-100635 binding in human cerebellum [35], with more pronounced labeling in grey matter [37]. In other studies, participants were excluded due to cerebellar TACs outside the range of the control population when the cerebellum was used as a reference region [41–43]. Other 5-HT_{1A} receptor radiopharmaceuticals also showed marked binding in the cerebellum, notably [^{11}C]CUMI-101 which showed a significant reduction of labeling following 8-OH-DPAT or WAY-100635 pre-injection [44]. Taken together, these observations indicate that 5-HT_{1A} receptors are indeed present in cerebellum grey matter, excluding the cerebellum (which contain the grey matter) as a reference region for [^{18}F]F13640.

[^{18}F]F13640 binding in other brain regions

In comparison with other 5-HT_{1A} radiopharmaceuticals, [^{18}F]F13640 showed particularly high uptake in raphe nuclei, cortical regions, and vermis in limbic and paralimbic regions. Although [^{18}F]MPPF also showed high uptake in raphe nuclei, it preferentially binds to limbic areas such as the hippocampus and amygdala whereas cortical regions showed less uptake [45]. Another antagonist radiopharmaceutical, [*carbonyl*- ^{11}C]WAY-100635, also showed high binding in the raphe and frontal cortex (like [^{18}F]F13640) but it also showed marked binding to the hippocampus (like [^{18}F]MPPF) [3]. Binding differences between [*carbonyl*- ^{11}C]WAY-100635, [^{18}F]MPPF and [^{18}F]F13640 are likely to be due to pharmacological differences between these 5-HT_{1A} receptor radiopharmaceuticals [46, 47]. We hypothesize that some regions such as the hippocampus, which showed high uptake with antagonist radiopharmaceuticals and less with the agonist [^{18}F]F13640, express a high proportion of G-protein uncoupled 5-HT_{1A} receptors. In contrast, regions with higher [^{18}F]F13640 binding values, such as the cingulate cortex, frontal cortex, or vermis, may express a relatively higher proportion of functionally active, G-protein-coupled receptors. Finally, regions such as raphe which showed high binding with both antagonist and agonist radiopharmaceuticals may express both states of 5-HT_{1A} receptors. Thus, differences in receptor binding patterns can be found between

agonists and antagonists radiopharmaceuticals targeting the same receptor. An *in vitro* study using [^{18}F]F13640 and [^{18}F]MPPF already explored this hypothesis and showed differences in binding between agonists and antagonists radiotracer with 5-HT $_{1A}$ in Alzheimer's disease [48]. Analogous results were found with D $_{2/3}$ dopamine receptors, for which the agonist, [^3H]NPA, showed a greater extent of than the antagonist [^{11}C]raclopride binding in a rat Parkinson's disease model [49].

Perspectives opened by [^{18}F]F13640

Based on the above observations, it can be considered that [^{18}F]F13640 has now the status of a radiopharmaceutical whose novel pharmacokinetic and radiopharmacological characteristics offer new perspectives in neurology and psychiatry.

First of all, the sustained binding of [^{18}F]F13640 will allow studies to be performed with multiple acquisitions at different late time points following the same injection. This experimental paradigm could, for example, allow exploration of changes in receptor coupling states associated with circadian rhythms. As an illustration, a previous preclinical study demonstrated that [^{18}F]F13640 is sensitive to fluctuations in serotonin levels [22] opening the way for exploration of *in vivo* serotonin release in physiological or pathological processes.

As demonstrated in the present study, [^{18}F]F13640 binding using the LREF method showed excellent test–retest parameters, a profile which makes it attractive for studies involving repeated measurements on the same subject, including drug occupancy and intervention studies, or for exploring pathological states at different time points—situations where reproducibility and reliability of the PET measurements is crucial.

In terms of its radiopharmacological characteristics, the binding pattern of [^{18}F]F13640 opens the way to informative imaging studies in neurology and psychiatry. For example, [^{18}F]F13640 shows high binding values in the raphe, consistent with the therapeutic-like activity of 5-HT $_{1A}$ receptor agonists in rodent and non-human primate models of L-DOPA-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease [50–52] which is the focus of an ongoing clinical study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05148884). [^{18}F]F13640 also shows high binding values in cortical regions associated with antidepressant activity or control of negative symptoms of schizophrenia [1–3]. 5-HT $_{1A}$ receptors in the brainstem are also promising targets to alleviate respiratory dysfunction in disorders such as Rett syndrome [56]. [^{18}F]F13640 could therefore be a promising tool to assess the role of 5-HT $_{1A}$ receptors in a variety of different disorders involving serotonergic mechanisms [15].

Conclusion

The present study reports the first-in-human validation and full kinetic modeling of [^{18}F]F13640 as the first 5-HT $_{1A}$ receptor agonist usable as a PET radiopharmaceutical. [^{18}F]F13640 shows many favorable radiopharmacological and radiopharmaceutical characteristics: radiolabeling with fluorine-18, high selectivity over cross-reacting sites, high reproducibility, and long-term binding which facilitates the experimental protocols. [^{18}F]F13640 shows pronounced binding in raphe nuclei and cortical regions, with notable differences in comparison with classical antagonist PET radiopharmaceuticals. All these characteristics confirm the interest of developing an agonist radiotracer able to specifically target functionally active 5-HT $_{1A}$ receptors in studies with long-term scans and test–retest protocols in order to investigate disease states in neurology and psychiatry.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00259-022-06103-1>.

Acknowledgements This work was supported by AVIESAN-ITMO Technologies for health, by the French Association for Research on Down Syndrome (AFRT), by the Hospices Civils de Lyon, by the imaging platform CERMEP, and by the LABEX PRIMES of Université de Lyon. PC was awarded a scholarship for the French Fund for Medical Research FRM (FDM202006011252).

Data Availability The datasets generated during this study are available from the corresponding author.

Declarations

Conflict of interest AN-T is a shareholder and an employee of Neurolix. The other authors have no disclosures.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Polter AM, Li X. 5-HT $_{1A}$ receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal*. 2010;22:1406–12.
2. Pike VW, McCarron JA, Lammerstma AA, Hume SP, Poole K, Grasby PM, et al. First delineation of 5-HT $_{1A}$ receptors in human brain with PET and [^{11}C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol*. 1995;283:R1–3.
3. Gunn RN, Sargent PA, Bench CJ, Rabiner EA, Osman S, Pike VW, et al. Tracer kinetic modeling of the 5-HT $_{1A}$

- receptor ligand [carbonyl-11C]WAY-100635 for PET. *NeuroImage*. 1998;8:426–40.
4. Zhuang Z-P, Kung M-P, Kung HF. Synthesis And Evaluation of 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)- p-iodobenzamido] ethyl]piperazine (p-MPPI): A new iodinated 5-HT1A ligand. *J Med Chem*. 1994;37:1406–7.
 5. Passchier J, van Waarde A, Pieterman RM, Elsinga PH, Pruijm J, Hendrikse HN, et al. Quantitative imaging of 5-HT(1A) receptor binding in healthy volunteers with [(18)f]p-MPPF. *Nucl Med Biol*. 2000;27:473–6.
 6. Passchier J, van Waarde A, Pieterman RM, Elsinga PH, Pruijm J, Hendrikse HN, et al. In vivo delineation of 5-HT1A receptors in human brain with [18F]MPPF. *J Nucl Med*. 2000;41:1830–5.
 7. Costes N, Merlet I, Ostrowsky K, Faillenot I, Lavenne F, Zimmer L, et al. A 18F-MPPF PET normative database of 5-HT1A receptor binding in men and women over aging. *J Nucl Med*. 2005;46:1980.
 8. Merlet I, Ostrowsky K, Costes N, Ryvlin P, Isnard J, Faillenot I, et al. 5-HT1A receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F]MPPF-PET study. *Brain*. 2004;127:900–13.
 9. Derry C, Benjamin C, Bladin P, le Bars D, Tochon-Danguy H, Berkovic SF, et al. Increased serotonin receptor availability in human sleep: evidence from an [18F]MPPF PET study in narcolepsy. *Neuroimage*. 2006;30:341–8.
 10. Kepe V, Barrio JR, Huang S-C, Ercoli L, Siddarth P, Shoghi-Jadid K, et al. Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:702–7.
 11. Meyer M, Lamare F, Asselineau J, Foubert-Samier A, Mazère J, Zanotti-Fregonara P, et al. Brain 5-HT1A receptor binding in multiple system atrophy: An [18 F]-MPPF PET study. *Mov Disord*. 2021;36:246–51.
 12. Billard T, Bars D, Zimmer L. PET radiotracers for molecular imaging of serotonin 5-HT1A receptors. *CMC*. 2013;21:70–81.
 13. Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M. The selective 5-HT1A antagonist radioligand [3H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT1A receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol*. 1995;288:173–86.
 14. Watson J, Collin L, Ho M, Riley G, Scott C, Selkirk JV, et al. 5-HT(1A) receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1108–14.
 15. Newman-Tancredi A, Depoortère RY, Kleven MS, Kołaczowski M, Zimmer L. Translating biased agonists from molecules to medications: Serotonin 5-HT1A receptor functional selectivity for CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2021;107937.
 16. Hendry N, Christie I, Rabiner EA, Laruelle M, Watson J. In vitro assessment of the agonist properties of the novel 5-HT1A receptor ligand, CUMI-101 (MMP), in rat brain tissue. *Nucl Med Biol*. 2011;38:273–7.
 17. Shrestha SS, Liow J-S, Lu S, Jenko K, Gladding RL, Svenningsson P, et al. 11 C-CUMI-101, a PET radio ligand, behaves as a serotonin 1A receptor antagonist and also binds to α 1 adrenoceptors in brain. *J Nucl Med*. 2014;55:141–6.
 18. Selvaraj S, Turkheimer F, Rosso L, Faulkner P, Mouchlianitis E, Roiser JP, et al. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission in humans: a [11C]CUMI-101 PET challenge study. *Mol Psychiatry*. 2012;17:1254–60.
 19. Girgis RR, Forbes A, Abi-Dargham A, Slifstein M. A positron emission tomography occupancy study of brexpiprazole at dopamine D2 and D3 and serotonin 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and serotonin reuptake transporters in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2020;45:786–92.
 20. Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu X-J, et al. Large-amplitude 5-HT1A receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology*. 2002;43:945–58.
 21. Vidal B, Fieux S, Colom M, Billard T, Bouillot C, Barret O, et al. 18F-F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. *Brain Struct Funct*. 2018;223:2973–88.
 22. Colom M, Vidal B, Fieux S, Redoute J, Costes N, Lavenne F, et al. [18F]F13640, a 5-HT1A receptor radiopharmaceutical sensitive to brain serotonin fluctuations. *Front Neurosci*. 2021;15:622423.
 23. Mérida I, Reilhac A, Redouté J, Heckemann RA, Costes N, Hammers A. Multi-atlas attenuation correction supports full quantification of static and dynamic brain PET data in PET-MR. *Phys Med Biol*. 2017;62:2834–58.
 24. Reilhac A, Merida I, Irace Z, Stephenson MC, Weekes AA, Chen C, et al. Development of a dedicated rebinner with rigid motion correction for the mMR PET/MR scanner, and validation in a large cohort of 11 C-PIB scans. *J Nucl Med*. 2018;59:1761–7.
 25. Heckemann RA, Keihaninejad S, Aljabar P, Rueckert D, Hajnal JV, Hammers A. Improving intersubject image registration using tissue-class information benefits robustness and accuracy of multi-atlas based anatomical segmentation. *NeuroImage*. 2010;51:221–7.
 26. Hammers A, Allom R, Koeppe MJ, Free SL, Myers R, Lemieux L, et al. Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Hum Brain Mapp*. 2003;19:224–47.
 27. Gousias IS, Rueckert D, Heckemann RA, Dyet LE, Boardman JP, Edwards AD, et al. Automatic segmentation of brain MRIs of 2-year-olds into 83 regions of interest. *NeuroImage*. 2008;40:672–84.
 28. Faillenot I, Heckemann RA, Frot M, Hammers A. Macroanatomy and 3D probabilistic atlas of the human insula. *NeuroImage*. 2017;150:88–98.
 29. Mottolese R, Redouté J, Costes N, Le Bars D, Sirigu A. Switching brain serotonin with oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:8637–42.
 30. Logan J. Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. *Nuclear Medicine and Biology*. 2000;27:661–70.
 31. Gunn RN, Lammertsma AA, Hume SP, Cunningham VJ. Parametric Imaging of Ligand-Receptor Binding in PET Using a Simplified Reference Region Model. *NeuroImage*. 1997;6:279–87.
 32. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86:420–8.
 33. Kegeles LS, Slifstein M, Xu X, Urban N, Thompson JL, Moadel T, et al. Striatal and extrastriatal dopamine D2/D3 receptors in schizophrenia evaluated with [18F]fallypride positron emission tomography. *Biol Psychiatry*. 2010;68:634–41.
 34. Vestergaard MB, Calvo OP, Hansen AE, Rosenbaum S, Larsson HBW, Henriksen OM, et al. Validation of kinetic modeling of [15O]H2O PET using an image derived input function on hybrid PET/MRI. *NeuroImage*. 2021;233:117950.
 35. Ohta S, Meyer E, Fujita H, Reutens DC, Evans A, Gjedde A. Cerebral [15 O]water clearance in humans determined by PET: I. theory and normal values. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:765–80.
 36. Parsey RV, Arango V, Olvet DM, Oquendo MA, Van Heertum RL, Mann JJ. Regional heterogeneity of 5-HT 1A receptors in human cerebellum as assessed by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:785–93.
 37. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999;38:1083–152.
 38. Hirvonen J, Kajander J, Allonen T, Oikonen V, Någren K, Hietala J. Measurement of serotonin 5-HT1A receptor binding using positron emission tomography and [carbonyl - 11 C]

- WAY-100635—considerations on the validity of cerebellum as a reference region. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:185–95.
39. Hall H, Lundkvist C, Halldin C, Farde L, Pike VW, McCarron JA, et al. Autoradiographic localization of 5-HT1A receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C] way-100635. *Brain Res.* 1997;745:96–108.
 40. Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain—III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience.* 1987;21:97–122.
 41. del Olmo E, Díaz A, Guirao-Piñeyro M, del Arco C, Pascual J, Pazos A. Transient localization of 5-HT1A receptors in human cerebellum during development. *Neurosci Lett.* 1994;166:149–52.
 42. Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ. Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: An 11 C-WAY 100635 PET study. *Neurology.* 2003;60:601–5.
 43. Turner MR, Rabiner EA, Hammers A, Al-Chalabi A, Grasby PM, Shaw CE, et al. [11C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT1A receptor changes in sporadic ALS. *Brain.* 2005;128:896–905.
 44. Rabiner EA, Messa C, Sargent PA, Husted-Kjaer K, Montgomery A, Lawrence AD, et al. A database of [11C]WAY-100635 binding to 5-HT1A receptors in normal male volunteers: normative data and relationship to methodological, demographic, physiological, and behavioral variables. *NeuroImage.* 2002;15:620–32.
 45. Milak MS, Severance AJ, Ogden RT, Prabhakaran J, Kumar JSD, Majo VJ, et al. Modeling considerations for 11 C-CUMI-101, an agonist radiotracer for imaging serotonin 1A receptor in vivo with PET. *J Nucl Med.* 2008;49:587–96.
 46. Costes N, Merlet I, Zimmer L, Lavenne F, Cinotti L, Delforge J, et al. Modeling [18 F]MPPF positron emission tomography kinetics for the determination of 5-hydroxytryptamine(1A) receptor concentration with multi injection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:753–65.
 47. Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol.* 2007;72:1393–401.
 48. Perez DM, Karnik SS. Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev.* 2005;57:147–61.
 49. Vidal B, Sebti J, Verdurand M, Fieux S, Billard T, Streichenberger N, et al. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT 1A receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology.* 2016;109:88–95.
 50. Palner M, Kjaerby C, Knudsen GM, Cumming P. Effects of unilateral 6-OHDA lesions on [3H]-N-propylorapomorphine binding in striatum ex vivo and vulnerability to amphetamine-evoked dopamine release in rat. *Neurochem Int.* 2011;58:243–7.
 51. Iderberg H, McCreary AC, Varney MA, Kleven MS, Koek W, Bardin L, et al. NLX-112, a novel 5-HT 1A receptor agonist for the treatment of 1 -DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. *Exp Neurol.* 2015;271:335–50.
 52. Depoortere R, Johnston TH, Fox SH, Brotchie JM, Newman-Tancredi A. The selective 5-HT1A receptor agonist, NLX-112, exerts anti-dyskinetic effects in MPTP-treated macaques. *Parkinsonism & Related Disorders.* 2020;78:151–7.
 53. Fisher R, Hikima A, Morris R, Jackson MJ, Rose S, Varney MA, et al. The selective 5-HT1A receptor agonist, NLX-112, exerts anti-dyskinetic and anti-parkinsonian-like effects in MPTP-treated marmosets. *Neuropharmacology.* 2020;167:107997.
 54. Buckley PF. Neuroimaging of schizophrenia: structural abnormalities and pathophysiological implications. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2005;1:193–204.
 55. Razakarivony O, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Towards in vivo imaging of functionally active 5-HT1A receptors in schizophrenia: concepts and challenges. *Transl Psychiatry.* 2021;11:22.
 56. Newman-Tancredi A, Bardin L, Auclair A, Colpaert F, Depoortere R, Varney MA. NLX-112, a highly selective 5-HT 1A receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT 1A receptors, respectively. *Brain Res.* 2018;1688:1–7.
 57. Abdala AP, Bissonnette JM, Newman-Tancredi A. Pinpointing brainstem mechanisms responsible for autonomic dysfunction in Rett syndrome: therapeutic perspectives for 5-HT1A agonists. *Front Physiol [Internet].* 2014 [cited 2021 Nov 24];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00205/abstract>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Résumé

Ce mémoire en vue d'obtention de l'habilitation à diriger des recherches présente et contextualise mes titres et travaux de recherche dans le domaine de l'imagerie médicale.

L'ensemble de ces travaux a pour objectif commun le développement de radiotraceurs pour la tomographie par émission de positons (TEP) en neurologie. Notre approche de recherche est translationnelle, du radiomarquage de précurseurs, au développement de nouvelles techniques analytiques ou méthodes *in vitro*, des études d'imagerie précliniques jusqu'aux premières études cliniques chez l'Homme.

Une première partie est consacrée au développement d'un radiotracer sélectif de la protéine α -synucléine. Les synucléinopathies désignent un ensemble de pathologies neurodégénératives caractérisées par des inclusions fibrillaires de protéine α -synucléine telles que la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy ou l'atrophie multisystématisée. Plusieurs candidats radiotraceurs ont pu être évalués. À la suite de nombreuses difficultés qui sont détaillées dans le rapport, cette thématique a malheureusement été abandonnée depuis mais ces travaux ont permis la mise au point de techniques radiopharmacologiques utiles pour le laboratoire.

Le deuxième axe examiné concerne le développement d'un nouveau radiotracer antagoniste des récepteurs 5-HT₆ de la sérotonine. Ce récepteur est fréquemment rapporté comme étant impliqué dans des processus physiopathologiques tels que les maladies neurodégénératives ou les troubles alimentaires. Un candidat radiotracer sélectif et spécifique des récepteurs 5-HT₆, le [¹⁸F]2FNQ1P, a été validé *in vivo* dans différents modèles animaux et tissus humains, et nous l'espérons, sera prochainement testé chez l'Homme en imagerie TEP.

Ensuite est présenté le développement du [¹⁸F]F13640, premier radiotracer TEP agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} jusqu'à l'étude de première administration chez l'Homme. Mon activité hospitalière au sein de la radiopharmacie du CERMEP me permet en effet de réaliser les premiers essais cliniques de pharmacologie TEP chez les volontaires sains.

Enfin, deux projets émergents sont présentés dans la thématique de développement de radiotraceurs du système sérotoninergique. Le premier pour alimenter les données précliniques sur le [¹⁸F]2FNQ1P en vue de son passage à l'homme. L'autre concerne l'utilisation en recherche clinique du [¹⁸F]F13640 chez des patients atteints d'algie vasculaire de la face. Un dernier projet porte sur l'étude du rôle de la sérotonine dans la dégénérescence fronto-temporale.

