

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 24 mars 2017
par

Marie Beaurain

né(e) le 26 décembre 1987, à Amiens

**Utilisation de la [¹⁸F]-FHBG comme outil de quantification de
cellules greffées intracérébrales exprimant l'HSV1-tk**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
Mme le Docteur Anne-Sophie Salabert
Mme le Professeur Brigitte Sallerin
M. le Docteur Mathieu Alonso
M. le Docteur Mathieu Tafani
Mme le Docteur Laurence Vaysse

Président
Directrice de Thèse
Juge
Juge
Juge
Membre invité





Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 24 mars 2017 24 mars 2017

par

Marie Beaurain

né(e) le 26 décembre 1987, à Amiens

**Utilisation de la [18F]-FHBG comme outil de quantification de
cellules greffées intracérébrales exprimant l'HSV1-tk**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck Saint-Marcoux

Mme le Docteur Anne-Sophie Salabert

Mme le Professeur Brigitte Sallerin

M. le Docteur Mathieu Alonso

M. le Docteur Mathieu Tafani

Mme le Docteur Laurence Vaysse

Président

Directrice de Thèse

Juge

Juge

Juge

Membre invité



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE



DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

CHEMIN Guillaume	(01.09.2015 au 31.08.2016) BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET CLINIQUE, CANCEROLOGIE
-------------------------	---



FABRE Gabin

01.10.2015 au 31.08.2016)
CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

Aux membres du jury

A Franck Saint-Marcoux, merci d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. C'est grâce à vous que j'ai pu réaliser mon stage de master 1 et faire un premier pas vers la recherche.

A Brigitte Sallerin, cela me touche sincèrement que vous ayez accepté de juger ce travail, je vous en suis reconnaissante.

A Mathieu Alonso, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci également pour ton soutien, ton aide lors des synthèses, ta bonne humeur quotidienne et ta confiance en moi inébranlable (même si je suis toujours aussi nulle au babyfoot). Ça fait toujours énormément de bien quand on nous fait sentir qu'on fait du bon travail, ça donne envie de se dépasser.

A Mathieu Tafani, merci de m'avoir accueillie au sein du service de radiopharmacie de Toulouse, de m'avoir permis de faire le DESC et d'ainsi pouvoir devenir radiopharmacienne quand je serai grande. Merci aussi de m'avoir permis d'intégrer l'unité ToNIC et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet. Merci également pour votre soutien, et tous vos conseils.

A Laurence Vaysse, merci d'avoir accepté de juger ce travail que tu connais si bien. Merci pour ton encadrement pendant mon stage de master, merci de m'avoir initié à la culture cellulaire, à la transfection des cellules, et de m'avoir donné envie de continuer.

A Anne-Sophie Salabert, Mr Burns, mon « maître vénéré », je ne sais par où commencer. Merci pour ton encadrement, que ce soit pendant le master, cette thèse ou pour la suite. Merci pour ta patience, ta confiance, ton amitié. Merci de m'avoir donné goût à la recherche même si c'est une voie jonchée d'obstacles. Tu resteras à jamais un exemple pour moi, et je ne crois pas que je serais arrivée jusqu'ici sans toi.

A toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler ces 6 derniers mois

A tous les membres du service de radiopharmacie, merci de m'avoir appris la préparation, merci pour ces nombreux fous rires, et pour votre bonne humeur quotidienne. Ça paraît tout bête, mais je suis toujours contente de venir bosser le matin et c'est grâce à vous. Un merci tout particulier à mon co-interne Kévin pour ces journées passées à siffler là-haut sur la colline, et à Fixou, Céline, Béber et Nico, pour ces cours de chants dans la cellule... *The show must go on !!*

A tous les membres du service de médecine nucléaire de Purpan, merci à tous les manips qui ne se fâchent jamais quand je viens les embêter pour prélever un patient, aux aides-soignantes et Olivier. Merci également aux médecins et aux internes, particulièrement à Pierre Payoux. Merci de m'avoir acceptée au sein de l'unité ToNIC pendant mon master, et de me permettre de prolonger cette aventure avec une thèse d'université. Merci pour tous les plans A, B, C et même D que vous avez eu la gentillesse de me proposer « au cas où ».

A ma famille

A mes parents. Maman, c'est à toi que je souhaite dédier cette thèse. Toi qui m'as donné le goût des études, et qui a toujours été d'un soutien sans faille. Papa, tu as toujours suivi mon



parcours, même de loin. Pas besoin de longs discours, ton regard me suffit. Fabienne, la première pharmacienne que j'ai admirée étant petite, grâce à qui inconsciemment j'ai choisi cette voie. Merci à Jacques aussi qui a toujours cru en moi.

A mes frères et sœurs, Alice, Hugues, Antoine, Thomas et Céline, merci à tous pour votre écoute et vos conseils, promis, un jour je ne serai plus étudiante ! Merci aussi à mon cousin Thomas, t'inquiètes pas, ton tour viendra bientôt !

A mes grands-parents. Ma grand-mère Thérèse qui me dit toujours que « de toute façon tu réussis tout ». Et mon papy Benedetto toujours si bienveillant même de là-haut... Merci aussi à mes grands-parents du nord André et Paulette.

Et puis la famille est grande après tout... Merci à ma tante Colette, ainsi qu'à mes petits bouts qui ne sont plus tous aussi petits aujourd'hui : Emil, Max, Camille, Romain et Raphaël. Sans oublier mes belles-sœurs Christelle et Nadia. Sofia, les mots me manquent, mais le soleil brille aujourd'hui grâce à toi. Merci à tous les autres membres de ma grande famille, on ne la choisit pas, mais pour rien au monde je n'en changerais !

A mes amis

A la « Divine team ». « Mais ça veut rien dire « Mettre de l'eau dans son vin », on « met de l'eau dans son verre » », Mayo, merci pour ces réinventions de proverbes et merci de m'avoir supportée au quotidien pendant 3 ans. Merci aussi à Perlette, Poppy et Jojo la fripouille. Il paraît que « les amis d'enfance si tu t'en débarrasse pas à l'adolescence ça te poursuit toute ta vie », et bien j'espère vous garder encore longtemps près de moi !

A toutes ces merveilleuses rencontres de la fac. Coco, ça a commencé par partager une tente au WEI, et je ris en repensant à toutes les colinades qui ont suivi. Sarah, je crois que l'imitation du mi-vélociraptor mi-Gilbert Montagné restera à jamais gravée dans ma mémoire. Amandine, merci pour ton esprit, pour ces conversations qui m'apportent beaucoup, même les plus farfelues. Oliv, sans toi je n'aurais jamais chanté de chanson intitulée « hernie, hernie iataaaale », et je n'aurais jamais pu tourner ce fabuleux reportage sur la cagole irlandaise. Merci aussi à Flo, Etienne, Gégé, Pierre, Hervé, Carole, Marion B., et Leslie. 1000 mercis pour tous ces fous rires en amphi, au RU, à la cafet ou à la BU. Pour toutes ces années passées et celles à venir.

Aux internes. Lauriane pour sa bonne humeur, Marie-Amélie pour sa mauvaise humeur, Morgane pour « *Don't Stop Me Now* », Marion G pour son sourire, Magda parce que « *I've got a feeling* », Julien, ravie d'avoir fait partie de ton harem, Cécile B pour ces conversations jardinage. Merci aussi à Oriane, Sara, Camille, Anne-Cé, Lucie, Béné, Pierre, pour ces 6 mois d'hiver passés ensemble à Cahors, et à tous les autres internes que j'ai côtoyé ces 4 dernières années.

A tous les autres, la liste est longue, mais ils se reconnaîtront.

A Thomas, merci de m'avoir soutenue pendant ces derniers mois. Tu penses avoir toujours été impuissant face à mes moments de panique, mais crois-moi tu m'as bien plus aidée que tu ne le penses. C'est cool de s'entendre dire « il fait ressortir le meilleur de moi-même »...

Et même si ça en fera rire plus d'un...A Lenny, Miaou !

Une page se tourne, j'accueille la suite avec impatience...



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des enseignants.....	4
Remerciements.....	7
Droits d'auteurs.....	9
Table des matières.....	10
Liste des abréviations.....	13
Table des illustrations.....	15
Table des tableaux.....	17
Introduction.....	18
I. Techniques d'imagerie <i>in vivo</i> permettant le suivi de cellules greffées.....	20
I.1. Généralités sur les différentes techniques d'imagerie moléculaire.....	20
I.1.1. Imagerie optique.....	20
I.1.2. Imagerie par résonance magnétique.....	22
I.1.3. Imagerie nucléaire.....	23
I.1.3.1 Principe de la tomographie par émission de positons et principaux radionucléides utilisés.....	24
I.1.3.2 Utilisation de cette technique pour l'imagerie de cellules greffées.....	29
I.2. Les gènes rapporteurs.....	31
I.2.1. Principe.....	31
I.2.2. Techniques d'incorporation d'un transgène, choix du vecteur.....	32
I.2.2.1 Transfert de gènes par l'intermédiaire de vecteurs viraux.....	32
I.2.2.2 Techniques de transfert de gènes n'utilisant pas de vecteurs viraux.....	33
I.2.2.2.1. Méthodes physiques.....	33
I.2.2.2.2. Méthodes chimiques ou vecteurs synthétiques.....	34
I.2.3. Eléments d'un plasmide.....	36
I.2.4. Différents gènes rapporteurs utilisés en TEP.....	37
I.2.4.1 Gènes codant pour un récepteur.....	38
I.2.4.2 Gènes codant pour un transporteur.....	39
I.2.4.3 Gènes codant pour une enzyme.....	40
I.3. Différentes sondes visualisables par TEP utilisées avec l'HSV1-tk :.....	41
I.4. Problématique de l'exploration cérébrale.....	44
I.4.1. Capacité du radiotracer à traverser la BHE.....	44
I.4.1.1 Transfert de médicaments au travers de la BHE par diffusion passive.....	46
I.4.1.1.1. Facteurs physiologiques liés à la BHE.....	46
I.4.1.1.2. Facteurs liés à la molécule.....	46
I.4.1.2 Transfert de médicaments au travers de la BHE par diffusion facilitée.....	48
I.4.1.3 Transfert de médicaments au travers de la BHE par transport actif.....	48
I.4.2. Métabolisme du radiotracer.....	48
II. Problématique et hypothèses.....	49
III. Validation de la captation de la [¹⁸ F]-FHBG par des cellules exprimant l'HSV1-tk <i>in vitro</i>	51
III.1. Synthèse de la [¹⁸ F]-FHBG.....	51
III.1.1. Généralités.....	51
III.1.1.1 Nomenclature.....	51
III.1.1.2 Structure.....	51
III.1.2. Principe général de la synthèse.....	51



III.1.3. Matières premières utilisées	52
III.1.4. Description du module de synthèse	52
III.1.5. Procédé de fabrication.....	53
III.1.6. Optimisation de la synthèse.....	54
III.1.7. Caractérisation du produit.....	55
III.1.8. Mesure du coefficient de partage octanol/tampon 7,4.....	55
III.1.9. Etude de la métabolisation du [¹⁸ F]-FHBG par les protéines plasmatiques :	56
III.2. Génération d'une lignée stable de cellules Neuro2A exprimant la TK	57
III.2.1. Principe	57
III.2.2. Protocole de transfection	58
III.2.3. Mise au point des conditions de transfection avec le gène de la <i>gfp</i>	58
III.2.4. Sélection de clones stables	59
III.3. Etude de la captation cellulaire de la [¹⁸ F]-FHBG <i>in vitro</i>	61
III.3.1. Protocole global de l'étude	61
III.3.1.1 Etude A	62
III.3.1.2 Etude B.....	62
III.3.1.2.1. Protocole	62
III.3.1.2.2. Acquisition des images grâce à la caméra TEP/CT	63
III.3.1.2.3. Analyse des images et quantification	63
III.3.2. Résultats et discussion	63
III.3.2.1 Etude A.....	63
III.3.2.2 Etude B	65
IV. Utilisation du couple HSV1-tk/[¹⁸ F]-FHBG dans le contrôle de la qualité de greffe cellulaire intracérébrale chez le rat	70
IV.1. Matériels et méthodes	70
IV.1.1. Induction des lésions corticales chez le rat.....	70
IV.1.2. Etude n°1 : Greffe intracérébrale de cellules exprimant l'HSV1-tk pré-incubées avec la [¹⁸ F]-FHBG	71
IV.1.2.1 Imagerie TEP des animaux.....	72
IV.1.2.2 Analyse des images et étude de quantification	72
IV.1.2.3 Analyses statistiques et détermination du seuil de sensibilité	73
IV.1.3. Etude n°2 : Marquage <i>in vivo</i> par injection intracérébrale de [¹⁸ F]-FHBG après greffe des cellules	73
IV.1.4. Etude n°3 : Etude de la stabilité de la capture de la [¹⁸ F]-FHBG <i>in vivo</i>	74
IV.2. Résultats	74
IV.2.1. Etude n°1 : Suivi <i>in vivo</i> des cellules greffées marquées avec la [¹⁸ F]-FHBG et quantification après greffe	74
IV.2.1.1 Contrôle de la qualité du protocole de greffe.....	74
IV.2.1.2 Quantification du nombre de cellules Neuro2a-TK marquées après greffe chez le rat	75
IV.2.2. Etude n°2 : Marquage <i>in vivo</i> pour la quantification des cellules greffées.....	77
IV.2.2.1 Etude n°3 : Stabilité de la capture cellulaire <i>in vivo</i>	79
IV.3. Discussion	80
Conclusion	85
Références bibliographiques	86
Annexes	94
Annexe 1. Synthèse de la [¹⁸ F]-FHBG	95



Annexe 1.1. Matières premières utilisées	95
Annexe 1.2. Interface graphique du module de synthèse	96
Annexe 1.3. Interface graphique des paramètres mesurés lors d'une synthèse	96
Annexe 1.4. Schéma du procédé de fabrication de la [¹⁸ F]-FHBG d'après Alauddin, Nuclear Medicine and Biology, 1998(Alauddin and Conti, 1998)	97
Annexe 1.5. Check-list de vérification avant le lancement de la synthèse	98
Annexe 2. Transfection des cellules et sélection de clones stables.....	99
Annexe 2.1. Protocole de transfection des lignées Neuro 2A	99
Annexe 2.2. Plasmide utilisé contenant le gène HSV1-tk	100
Annexe 3. Schéma récapitulatif de l'étude de captation cellulaire de [¹⁸ F]-FHBG faisant varier le temps d'incubation	101
Serment de Galien	102



Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
AMPc	Adénoside Monophosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BLI	Bioluminescence Imaging
°C	Degré Celsius
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
cm	Centimètre
CMV	Cytomégalovirus
Cpm	Coups par minute
CT	Computed Tomography
D ₂ R	Dopamin Receptor D2
Da	Dalton
EC	Electronic capture ou Capture électronique
[¹⁸ F]-FDG	2-deoxy-2-[¹⁸ F] fluoro-D-glucose
[¹⁸ F]-FEAU	1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-ethyluridine
[¹⁸ F]-FESP	[¹⁸ F]-fluoroethylspiperone
[¹⁸ F]-FFEAU	(1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β- D-arabinofuranosyl)-5-(2-fluoroethyl)uridine
[¹⁸ F]-FHBG	9-(4-[¹⁸ F]Fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine
[¹⁸ F]-FHOMP	6-((1-[¹⁸ F]-fluoro-3-hydroxypropan-2-yloxy)methyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione
[¹⁸ F]-FHPG	9-((3-[¹⁸ F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)-methyl)guanine
[¹⁸ F]-HFB	Hexadecyl-4-[¹⁸ F] fluorobenzoate
FID	Free Induction Decay ou signal de précession libre
FLI	Fluorescence Imaging
Fluc	Firefly luciferase
g	Gramme
GBq	Giga Becquerel
Gfp	Green Fluorescent Protein
H	Heure
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSV1-tk	Herpes Simplex Virus thymidine kinase 1
[¹²⁴ I]-FIAU	(1-(2'-deoxy-2'- fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodouridine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intraveineuse
j	Jours
kb	Kilobase
keV	Kilo électron volt
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µmol	Micromole
M	Molaire
MBq	Mega Becquerel
MeV	Méga électron Volt
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre



MRP	Médicament Radiopharmaceutique
N	Normalité
Neuro2a-TK	Cellules Neuro2a transfectées avec l'HSV1-tk
nm	Nanomètre
NIS	Sodium Iodide Symporter
NSCs	Cellules Souches Neurales
PEI	Polyéthylémine
PPI	Pour Préparation Injectable
Rluc	Renilla luciferase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
SNC	Système nerveux central
SUV	Standard Uptake Value
SVF	Sérum de veau fœtal
TEMP	Tomographie à Emission Mono-Photonique
TEP	Tomographie à Emission de Positons
UV	Ultra-Violet
VOI	Volume of Interest
v/v	Volume/volume



Table des illustrations

Figure 1 : Principes de la fluorescence et de la bioluminescence (Wolfs et al., 2015).....	21
Figure 2 : Diagramme de stabilité des isotopes	25
Figure 3 : Désintégration β^+	25
Figure 4 : Réaction d'annihilation du positon	25
Figure 5 : Principe de détection en coïncidence. Après une multitude de réactions d'annihilation, il est possible de localiser la source d'émission des positons dans les 3 dimensions de l'espace (Wolfs et al., 2015).....	26
Figure 6 : Radiomarquage direct (Wolfs et al., 2015).....	29
Figure 7 : Illustration du marquage direct au niveau cellulaire : immédiatement après l'injection de traceur (A), et quelques heures après (B) (Herschman, 2004)	30
Figure 8 : Radiomarquage indirect (Wolfs et al., 2015)	30
Figure 9 : Illustration du radiomarquage indirect : juste après l'injection du traceur (A), et quelques heures après (B) (Herschman, 2004)	31
Figure 10 : Principe d'un vecteur viral (Pitard, 2014)	32
Figure 11 : Transfert d'ADN dans une cellule par l'intermédiaire d'un vecteur non viral composé de lipides cationiques (Pitard, 2014)	35
Figure 12 : Illustration schématique de l'expression de 3 types de gènes rapporteurs utilisés en médecine nucléaire (Chao et al., 2013)	38
Figure 13 : Transcription d'un gène rapporteur et captation intracellulaire d'une sonde moléculaire.....	41
Figure 14 : Schémas de la barrière hémato-encéphalique et de ses différents constituants ("AP Bio The Blood Brain Barrier," n.d.).....	45
Figure 15 : Molécule de [^{18}F]-FHBG	51
Figure 16 : Schéma de synthèse de la [^{18}F]-FHBG(Ponde et al., 2004).....	51
Figure 17 : Automate Synchrom R&D.....	52
Figure 18 : Exemple de radiochromatogramme RA obtenu après purification par HPLC semi-préparative, pic 1=fluor libre et pic 2 = [^{18}F]-FHBG (à gauche), et rendements de synthèse de la [^{18}F]-FHBG en fonction de la température de substitution nucléophile (à droite).	54
Figure 19 : Exemple de radiochromatogrammes en détection γ après injection de la [^{18}F]-FHBG purifié (a) et en détection UV, avec co-injection de FHBG froid (b) obtenus sur colonne d'HPLC analytique	55
Figure 20 : Images au microscope à fluorescence en lumière visible (a, c) et en lumière UV (488 nm) (b, d) des lignées Neuro2A transfectées avec le gène de la gfp en utilisant 2,5 μL (a, b) ou 5 μL (c, d) de lipofectamine	59
Figure 21 : Image au microscope des lignées Neuro2Aensemencées en présence de concentrations croissantes de néomycine à J0 (a), à J+5 avec 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de néomycine (b), et à J+5 avec 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de néomycine (c).....	60

Figure 22 : Visualisation à J+8 au microscope à fluorescence des cellules vivantes (en vert) et des cellules mortes (en rouge) à des concentrations en néomycine égales à 200µg/mL(a), 400µg/mL(b), 600µg/mL(c), et 800µg/mL(d).....	61
Figure 23 : Evolution de la radioactivité contenue dans les cellules, exprimée en coups par minute (a) ou en pourcentage de captation (b) en fonction de la durée d'incubation des cellules avec la [¹⁸ F]-FHBG	64
Figure 24 : Rapports signal/bruit observés avec 115 et 555 kBq/mL de [¹⁸ F]-FHBG.....	65
Figure 25 : Plaque de 96 puits contenant différentes quantités de cellules exprimant la TK et témoins (a) et son image obtenue grâce à la caméra TEP/CT.....	66
Figure 26 : Signal observé pour chaque quantité de cellules avec le compteur γ (n = 3), cellules exprimant la TK en bleu et cellules contrôles en rouge (a). Signal observé pour chaque quantité de cellules avec la caméra TEP/CT (n = 5), cellules exprimant la TK en	66
Figure 27 : Comparaison des signaux moyens observés avec le compteur γ (en bleu) et la caméra TEP/CT (en rouge)	66
Figure 28 : Comparaison des signaux observés avec les cellules exprimant la TK et les cellules témoins grâce à la caméra TEP.....	68
Figure 29 : Image de la tête d'un rat maintenue grâce au cadre stéréotaxique avant injection de malonate (A), et représentation schématique de la localisation de la lésion corticale (B).70	
Figure 30 : Cerveau de rat lésé (A), coupes de cerveaux de rats lésés avant (B) et après greffe (C) et analyse par immunohistochimie (D) – Unité ToNIC, UMR1214 Equipe 2.....	71
Figure 31 : Images TEP de rats greffés dans le cas d'une injection faite dans de bonnes conditions (A), d'une injection d'un volume trop important de suspension cellulaire (B), ou lors d'un mauvais positionnement de l'aiguille (C)	74
Figure 32 : Comparaison du signal observé dans le cervelet par rapport au coeur (ratio cpm cervelet / cpm coeur) lors d'une injection de 1 million de cellules témoins dans un volume de 8µL (orange), 3 million de cellules transfectées dans 8µL (vert), et 1 million de cellules transfectées dans 10µL (bleu).	75
Figure 33 : Images PET/CT des rats greffés avec les cellules Neuro2a exprimant la TK pré-incubées avec la [¹⁸ F]-FHBG selon différentes axes. Les quantités de cellules greffées étaient de : 1x10 ⁵ (ADE), 5x10 ⁵ (BFG); et 1x10 ⁶ cellules (CHI).....	76
Figure 34 : Signal observé chez les rats corrigé de la décroissance (triangles verts) en fonction de la quantité de cellules Neuro2a-TK marquées avec de la [¹⁸ F]-FHBG qu'ils ont reçu (n = 5).....	76
Figure 35 : Marquage in vivo par injection de [¹⁸ F]-FHBG après greffe des cellules exprimant la TK.....	78
Figure 36 : Rapport du signal observé au niveau du cerveau par rapport à celui du coeur en fonction du temps écoulé depuis l'injection du traceur	78
Figure 37 : Images TEP/CT du rat témoin non greffé ayant reçu une injection de [¹⁸ F]-FHBG intracérébrale (A), et d'un rat ayant été greffé avec des cellules Neuro2a-TK pré-marquées avec la [¹⁸ F]-FHBG (B)	79



Table des tableaux

Tableau 1 : Principales propriétés de la TEP et de la TEMP.....	24
Tableau 2 : Principaux radioéléments utilisés en TEP (Disselhorst et al., 2010), (Paans, 1997), (Vercouillie, 2014), (Walther et al., 2011), (Li and Conti, 2010).....	27
Tableau 3 : Atouts et limites des vecteurs viraux (Pitard, 2014).....	33
Tableau 4 : Méthodes physiques de transfert de gènes (Ramamoorth and Narvekar, 2015).....	34
Tableau 5 : Comparaison des différentes sondes utilisables pour visualiser l'expression de l'HSV1-tk	43
Tableau 6 : Aires sous la courbe (S (uV*s)) et pourcentages de [¹⁸ F]-FHBG et de son métabolite après 5 min, 20 min, 1h ou 2h d'incubation dans le plasma.....	57



Introduction

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules vivantes afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe lorsqu'elle est altérée par un accident, une pathologie ou le vieillissement. Ces cellules peuvent être obtenues à partir de cellules souches pluripotentes (pouvant donner tous types de cellules) ou multipotentes (pouvant donner un nombre limité de types de cellules) provenant du patient lui-même ou d'un donneur.

Le concept de thérapie cellulaire existe depuis plus d'un siècle, et les avancées technologiques allant des études pré-cliniques à cliniques promettent de révolutionner le traitement de nombreuses pathologies comme les maladies auto-immunes ou les pathologies touchant des tissus aux capacités de régénération limitées comme le tissu cardiaque ou nerveux (Wolfs et al., 2015). Le principal obstacle à une plus large acceptation de cette technique est que les mécanismes conduisant à son succès ou son échec sont encore méconnus. La détermination de différents paramètres comme la mesure du nombre de cellules transplantées, de leur localisation, l'évaluation de leur survie, de leur fonctionnalité, ou encore de leur capacité de division -qui pourrait entraîner un risque de cancérisation en cas de multiplication anarchique- après transplantation pourrait permettre une meilleure compréhension de ces mécanismes.

La thérapie cellulaire intracérébrale est basée sur la greffe de cellules souches neurales multipotentes (NSCs) afin de reconstruire le tissu nerveux endommagé. Ces cellules ont en effet la capacité de se différencier en 3 types de cellules du système nerveux central : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Daadi et al., 2013).

Afin d'étudier la régénération du tissu nerveux et l'effet de cette thérapie sur la récupération des fonctions altérées, des équipes de recherche étudient différentes modalités d'utilisation de ces cellules en recherche préclinique.

L'équipe iDREAM de l'unité ToNIC (UMR1214) de l'INSERM tente ainsi d'amplifier des NSCs humaines *in vitro* afin de les greffer chez des rats ayant subi une lésion cérébrale. Afin d'évaluer la survie, la migration et l'intégration de ces cellules après greffe, les animaux sont ensuite sacrifiés et les cerveaux analysés.

Les méthodes classiques de suivi longitudinal *in vivo* nécessitent le sacrifice régulier de groupes d'animaux, impliquant donc l'utilisation de grands effectifs. L'intérêt des méthodes d'imagerie pré-clinique, pour la plupart des issues des modalités d'imagerie médicale, est l'amélioration du suivi de la pathologie au cours du temps et de l'action des thérapeutiques chez le même animal de façon totalement non invasive. La puissance statistique de l'étude est ainsi renforcée, et le nombre d'animaux nécessaire peut être réduit en accord avec les règles éthiques de l'expérimentation animale (règle des trois R : Raffiner, Réduire et Remplacer).

A ce jour, l'imagerie *in vivo* chez le petit animal est en plein essor et présente un intérêt reconnu dans les domaines de la recherche biomédicale et du développement de nouveaux médicaments.

Les applications de l'imagerie du petit animal sont principalement :

- la compréhension des mécanismes de développement d'une pathologie,
- l'activité et l'efficacité biologique d'une nouvelle molécule ou d'une nouvelle thérapie,
- l'étude et l'évaluation spécifique de la sécurité et de la toxicité de nouvelles thérapies.

Par ailleurs, les modalités d'imagerie du petit animal étant pour la plupart issues de la clinique, elles vont permettre d'explorer les paramètres par les mêmes méthodologies et la même démarche intellectuelle que chez l'homme, et ainsi s'inscrire dans le cadre de la « recherche translationnelle ». Ce type de démarche vise à accélérer l'innovation et le passage en clinique des nouvelles thérapies.

Les techniques d'analyse *ex vivo*, bien que spécifiques, demandent le sacrifice de l'animal et ne permettent donc pas le suivi longitudinal de l'évolution des cellules greffées. Ces techniques sont dépendantes de la qualité des tissus prélevés. Lors des phases aiguës de greffe ou lors de l'implantation de biomatériau, ces tissus sont fragilisés et leur intégrité n'est plus garantie lors de leur coupe ou de leur coloration par techniques d'anatomo-pathologie. Nous avons donc voulu utiliser un outil permettant l'évaluation longitudinale et non invasive du comportement et de la survie des cellules *in vivo* après transplantation.

Nous avons choisi une méthode utilisant un gène rapporteur et une sonde radioactive. Dans un premier temps, nous avons mis au point la radiosynthèse de la sonde au centre TEP du CHU de Toulouse, puis nous avons modifié génétiquement des cellules Neuro2A afin de leur faire exprimer un gène rapporteur. Dans un second temps nous avons étudié les paramètres *in vitro* de captation de la sonde par ces cellules pour définir les conditions expérimentales optimales et réalisé une gamme étalon afin de pouvoir relier le signal obtenu à une quantité de cellules. Enfin, nous avons utilisé cette technique pour contrôler le processus de greffe.



I. Techniques d'imagerie *in vivo* permettant le suivi de cellules greffées

I.1. Généralités sur les différentes techniques d'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire permet le suivi longitudinal et non invasif du comportement des cellules *in vivo* après transplantation (Massoud and Gambhir, 2003). C'est une technique d'imagerie en plein essor qui allie la biologie moléculaire, l'imagerie médicale, et plus récemment d'autres disciplines comme la biologie cellulaire, la chimie, la pharmacologie, la génétique, la physique biomédicale, l'ingénierie, et la médecine (Kang and Chung, 2008). Deux approches sont utilisées : le marquage direct et indirect. Le marquage direct fait appel à une sonde moléculaire qui est incorporée dans la cellule ou qui se fixe à sa surface par incubation *in vitro* (Wolfs et al., 2015). Le marquage indirect quant à lui, est réalisé par modification génétique des cellules par un transgène, appelé gène rapporteur, dont le produit d'expression permet, soit leur visualisation directe, soit d'interagir avec une sonde moléculaire pour générer un signal. Ce signal peut être visualisé par des techniques d'imagerie optique, imagerie par résonance magnétique (IRM), ou par imagerie nucléaire (Nguyen et al., 2014).

I.1.1. Imagerie optique

L'imagerie optique utilise la lumière visible. Il existe deux stratégies : l'imagerie par bioluminescence (BLI), et l'imagerie par fluorescence (FLI). Ces techniques sont utilisées depuis longtemps en recherche *in vitro* et *ex vivo* comme par exemple avec la microscopie à fluorescence. Mais ces concepts ont depuis été étendus au champ de l'imagerie *in vivo* non invasive. La BLI et la FLI détectent des photons ayant des longueurs d'onde appartenant au domaine du visible, la différence entre les deux, est la manière dont ces photons sont générés (Cf. Figure 1).

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'un fluorophore par un rayonnement lumineux ayant une longueur d'onde spécifique. Cette excitation est immédiatement suivie de l'émission d'un rayonnement dit « rayonnement de fluorescence » ayant une longueur d'onde supérieure à celle du rayonnement excitateur (Wolfs et al., 2015). La *green fluorescent protein* (GFP) est un exemple de fluorophore émettant une lumière de fluorescence verte.

La bioluminescence (BLI) quant à elle, est basée sur la détection de la lumière visible émise par le biais d'une réaction catalysée par des enzymes appelées luciférases. Il n'est pas nécessaire avec cette méthode de stimuler les molécules marquées par une source de lumière externe puisque la BLI réagit à un stimulus donné *in vivo*. Le gène codant pour la luciférase doit avoir été introduit dans la cellule hôte. Il existe deux luciférases principalement utilisées en BLI : la Firefly luciférase (Fluc), et la Renilla luciférase (Rluc). Fluc est capable d'oxyder une molécule exogène, la D-luciférine, en présence d'oxygène et d'adénosine triphosphate

(ATP), ce qui génère un signal lumineux visible (Wolfs et al., 2015). RLuc n'a pas besoin d'ATP mais seulement d'oxygène pour oxyder son substrat, la coelentérazine, et générer elle aussi un signal lumineux visible. L'avantage de Fluc, est qu'il permet de visualiser des cellules ou tissus vivants, car il y a besoin d'ATP pour catalyser la réaction. Dans la plupart des espèces, la production spontanée de lumière est très faible, ce qui amène à un rapport signal sur bruit très élevé. La BLI est ainsi une technique extrêmement sensible (limite de détection : 10^3 cellules (Nguyen et al., 2014)), mais ayant une relativement faible résolution (5 à 20 mm (Nguyen et al., 2014)) due à la diffusion des photons. Un autre problème est l'atténuation par les tissus des photons générés, principalement causée par l'absorption de la lumière, par l'hémoglobine contenue dans l'organisme, mais également par les tissus denses comme l'os ce qui est un inconvénient majeur lorsqu'on souhaite imager des tissus ou cellules situées sous la boîte crânienne.

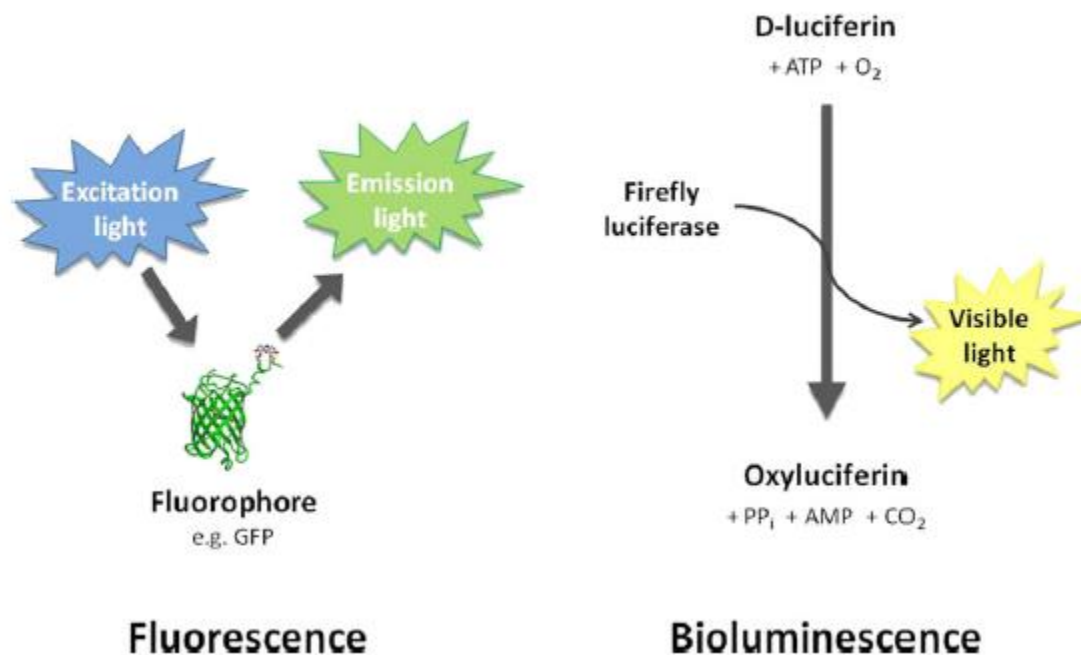


Figure 1 : Principes de la fluorescence et de la bioluminescence (Wolfs et al., 2015).

Ainsi, les gènes codant pour la GFP ou une luciférase, constituent deux exemples de gènes rapporteurs pouvant être utilisés pour visualiser des cellules greffées en marquage indirect. La BLI, en particulier, de par sa très grande sensibilité constitue une technique d'imagerie largement utilisée pour la visualisation de cellules souches greffées chez l'animal (Cao et al., 2004), mais aussi pour l'imagerie de cellules souches endogènes dans le cerveau de souris (Reumers et al., 2008).

Le principal avantage de l'imagerie optique est que c'est une technique simple à mettre en œuvre, très rapide, peu coûteuse, très sensible, et qu'elle permet d'acquérir différents signaux

moléculaires en même temps. Son principal inconvénient est la faible pénétration tissulaire et l'atténuation du signal par ces mêmes tissus, ce qui la rend difficilement transférable en clinique. Elle constitue cependant un formidable outil rapide et peu coûteux utilisé dans une large variété de domaines de recherche (Wolfs et al., 2015).

I.1.2. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a révolutionné l'imagerie médicale, d'une part par le contenu informationnel et la qualité des images obtenues, et d'autre part par son innocuité pour la santé puisqu'elle n'utilise pas de rayonnements ionisants. Elle repose sur la mesure du retour à l'équilibre des moments magnétiques de spin des noyaux d'hydrogène après résonance, phénomène qui apparaît, lorsque ces noyaux, préalablement placés dans un champ magnétique statique intense, sont exposés à une onde électromagnétique particulière. La vitesse de retour à l'équilibre est reflétée par deux composantes : le temps de relaxation longitudinal (T1), reflétant l'environnement des protons au niveau tissulaire notamment la viscosité du milieu, et le temps de relaxation transversal (T2), traduisant en plus de la viscosité du milieu, l'interaction des protons entre eux au niveau moléculaire. Ces deux temps, T1 et T2, sont ainsi propres à chaque type de tissu et en rapport avec leur nature histologique et cellulaire (Jacobs and Cherry, 2001). Il sera ainsi possible de visualiser les différences (ou contraste) des propriétés magnétiques de l'environnement des noyaux d'hydrogène, variables d'un point à l'autre à l'intérieur du corps (Berry and Gantet, 2014).

En routine, cette technique d'imagerie est utilisée dans le but d'obtenir des images morphologiques, mais elle a également été utilisée dans plusieurs études de suivi de cellules souches greffées grâce à une technique de marquage direct. Cette technique fait appel à des nanoparticules de fer oxydé appelées *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIONs) (Nguyen et al., 2014). Ces particules sont endocytées à l'intérieur des cellules, les rendant visualisables par IRM. Les avantages de cette technique sont sa haute résolution (25 à 500 μm en pré-clinique et 0,5 à 5 mm en clinique) (Nguyen et al., 2014), le contraste important entre les tissus mous, et la persistance du marquage dans le temps Daadi *et al* en 2009 ont montré que ces particules pouvaient persister à l'intérieur des cellules jusqu'à deux mois (Daadi et al., 2009). Cependant, il reste difficile d'estimer la biodistribution, la viabilité, ou de dénombrer les cellules par IRM (Terrovitis et al., 2008). En effet, la persistance des SPIONs à l'intérieur des cellules, même après leur mort, ne permet pas de les différencier des cellules vivantes. Lorsque ces cellules mortes sont phagocytées par des macrophages, les SPIONs se retrouvent alors internalisés dans ces derniers, ce qui génère un signal résiduel gênant pour le dénombrement des cellules (Terrovitis et al., 2008). Enfin, lorsque les cellules marquées prolifèrent, la quantité fixe de SPIONs se répartit entre les cellules filles, ce qui ne permet pas non plus de mettre en évidence une éventuelle prolifération cellulaire (Li et al.,



2008). Cette capacité des macrophages à internaliser les SPIONs libres, peut aussi être utilisée pour les marquer et les suivre jusqu'aux sites inflammatoires (Yilmaz et al., 2013).

I.1.3. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est un mode d'imagerie basé sur l'administration d'un médicament radiopharmaceutique (MRP), ou traceur, composé d'un radionucléide (ou radioisotope) qui peut être isolé (ex : ^{131}I ou iode 131 qui se fixe directement au niveau de la glande thyroïde) ou lié chimiquement à une molécule « vectrice » ayant des propriétés biologiques particulières (Wolfs et al., 2015). Les photons émis par la désintégration du radionucléide sont ensuite détectés, grâce à une gamma-caméra permettant la détermination de la biodistribution du traceur. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle car elle permet d'étudier des processus pathologiques, non pas, par les altérations anatomiques qu'ils induisent, mais par les modifications fonctionnelles et moléculaires qu'ils provoquent sur le fonctionnement d'un organe (Buvat, 2003).

Il existe deux principales modalités d'imagerie nucléaire :

- la tomographie par émission de positons ou TEP (en anglais : *positron emission tomography* ou PET) ;
- et la tomographie à émission monophotonique ou TEMP (en anglais : *single photon emission computed tomography* ou SPECT).

La sensibilité de ces techniques est de l'ordre du picomolaire, ainsi, des concentrations sub-pharmacologiques de ces traceurs peuvent être détectées. La plupart des gamma-caméras (TEP ou TEMP) sont combinées à d'autres modalités d'imagerie comme le scanner (*X-ray based computed tomography*, CT) ou plus rarement l'IRM. Le développement de ces techniques d'imagerie multimodales permet la superposition des images fonctionnelles et métaboliques apportées par l'imagerie nucléaire et des images anatomiques obtenues grâce au scanner ou à l'IRM. La fusion des images permet ainsi la localisation précise de l'information fonctionnelle (imagerie moléculaire) obtenue (Wolfs et al., 2015). Les principales différences entre TEP et TEMP sont présentées dans le Tableau 1.



	TEP	TEMP
Sensibilité(Rahmim and Zaidi, 2008)	+++	++
Résolution des gamma-caméras en clinique(Nguyen et al., 2014)	2 à 6 mm	7 à 15 mm
Résolution des gamma-caméras en pré-clinique(Nguyen et al., 2014)	0,8 à 1,5 mm	0,3 à 2 mm
Collimation(Wolfs et al., 2015)	Collimation temporelle	Collimation mécanique et donc sensibilité plus faible
Résolution temporelle(Wolfs et al., 2015)	Haute, ce qui permet les études cinétiques	Faible, due aux temps d'acquisition plus longs
Radionucléides utilisés(Rahmim and Zaidi, 2008)	Emetteurs β^+	Désintégration par émission γ ou par capture électronique
Demi-vie des radionucléides les plus utilisés(Wolfs et al., 2015)	Courte	Longue

Tableau 1 : Principales propriétés de la TEP et de la TEMP

De par sa grande sensibilité et sa meilleure résolution par rapport à la TEMP , nous n'envisagerons ici que la TEP.

I.1.3.1 Principe de la tomographie par émission de positons et principaux radionucléides utilisés

Cette technique d'imagerie est basée sur l'utilisation de radioisotopes émetteurs de positons ou particules β^+ . Ces isotopes instables sont en excès de protons (Cf. Figure 2, (Gantet, 2015)), un proton se transforme donc spontanément en neutron (un quark up se transforme en quark down), ce qui entraîne l'émission d'un neutrino ν et d'un positon ou particule β^+ (Cf. Figure 3, (Arlicot, 2014)).



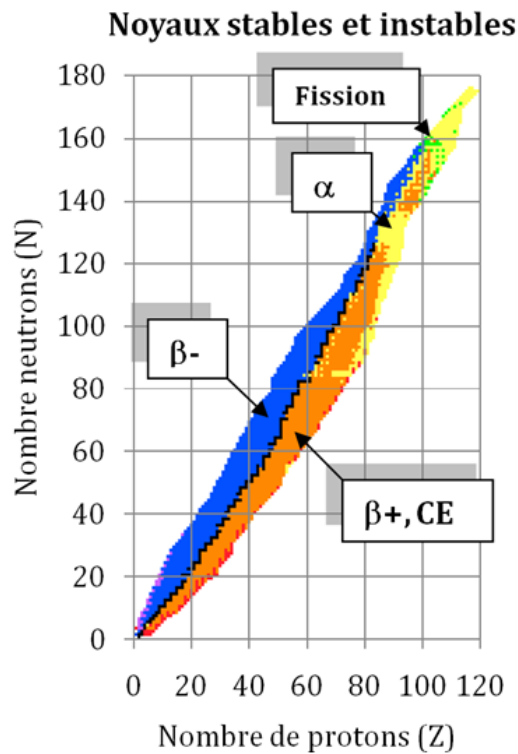


Figure 2 : Diagramme de stabilité des isotopes

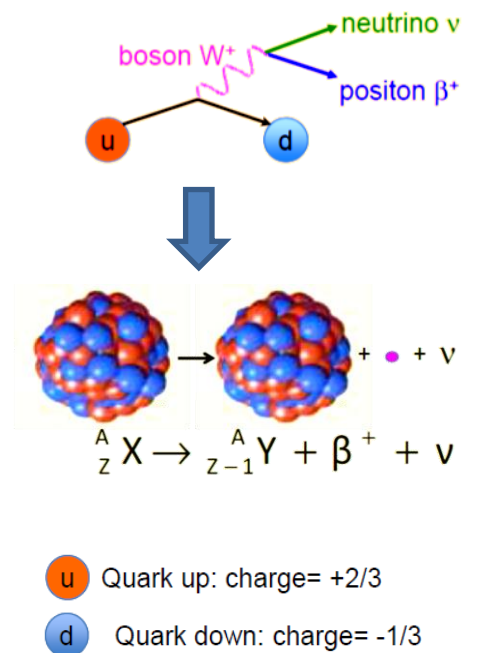


Figure 3 : Désintégration β^+

Le positon émis va ensuite rapidement perdre son énergie cinétique par interactions électrostatiques avec le milieu environnant, puis, rencontrer un électron (son antiparticule). Cette interaction matière-antimatière entraîne l'annihilation (Cf. Figure 4, (Arlicot, 2014)), c'est-à-dire la disparition du positon et de l'électron, et l'apparition de deux photons γ de 0,511 MeV, émis dans la même direction, mais dans des sens opposés. La détection simultanée de cette paire de photons γ (collimation temporelle) permet de localiser le lieu de l'annihilation, et donc le radioélément avec une incertitude plus ou moins grande selon le parcours de la particule β^+ (Wolfs et al., 2015).

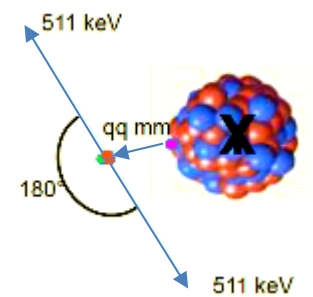


Figure 4 : Réaction d'annihilation du positon

Une caméra TEP est constituée d'une série de cristaux de détection disposés en couronne autour du lit d'examen où se trouve le patient, couplés à un système de détection en coïncidence (Phelps et al., 1975). La détection quasi-simultanée de ces deux photons de 511 keV par deux détecteurs opposés, indique qu'une réaction d'annihilation s'est produite sur la ligne séparant ces deux détecteurs. Cette coïncidence dans le temps constitue une signature très forte qui les distingue d'autres photons. L'acquisition de données à des angles différents, permet la reconstruction d'une série de coupes dites tomographiques. A partir de ces coupes

il est possible de déterminer la localisation du radioisotope dans les trois dimensions de l'espace (Cf. Figure 5) (Wolfs et al., 2015).

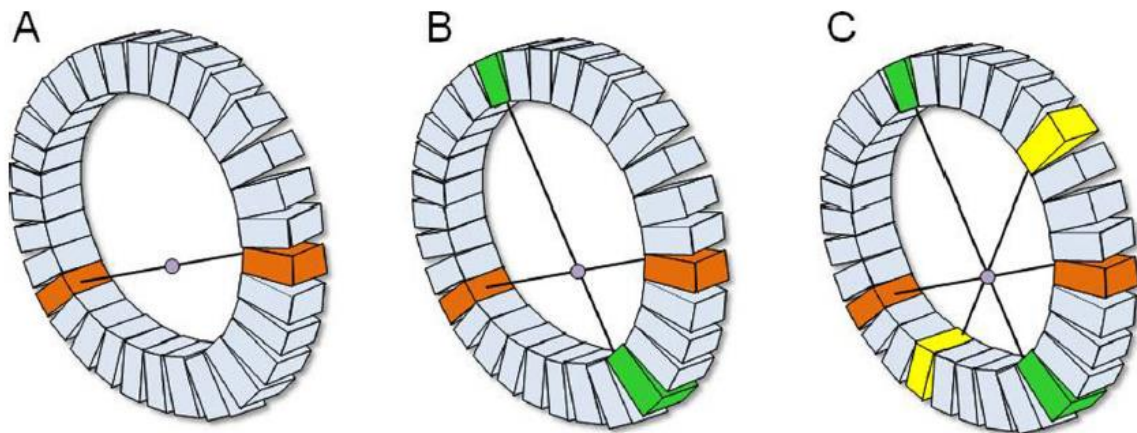


Figure 5 : Principe de détection en coïncidence. Après une multitude de réactions d'annihilation, il est possible de localiser la source d'émission des positons dans les 3 dimensions de l'espace (Wolfs et al., 2015)

L'avantage de cette technique d'imagerie – en plus de sa grande résolution - est la possibilité d'obtention d'images en trois dimensions reflétant la distribution du traceur (Wolfs et al., 2015). En fonction du vecteur utilisé, cette technique permet d'étudier diverses caractéristiques biologiques des tissus comme la perfusion d'un organe, son métabolisme, la densité en récepteurs, ou encore l'activité enzymatique. Grâce à la détection en coïncidence des deux photons de 511 keV, cette technique est quantitative.

Il existe plusieurs radionucléides émetteurs β^+ développés pour une utilisation en TEP (Cf. Tableau 2).

Radionucléide	Demi-vie	Mode de décroissance (%)	$E_{\beta+\max}$ (keV)	Parcours moyen du $\beta+$ (mm) dans l'eau	Produit de décroissance	Méthode de production la plus courante	Chimie	Exemples d'application
Fluor 18 ^{18}F	110 min	$\beta+$ (97), EC (3)	635	0,62	Oxygène 18 ^{18}O	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ (cyclotron)	Chimie organique	^{18}F FDG : analogue du glucose, traceur utilisé en oncologie
Carbone 11 ^{11}C	20,4 min	$\beta+$ (99,8), EC (0,2)	960	1,1	Bore 11 ^{11}B	$^{14}\text{N}(d,n^4\text{He})^{11}\text{C}$ (cyclotron)	Chimie organique	$^{11}\text{CH}_3\text{I}$ utilisé pour le marquage de nombreuses molécules organiques comme le [N-methyl- ^{11}C]PIB marqueur des plaques amyloïdes
Azote 13 ^{13}N	9,96 min	$\beta+$ (100)	1190	1,5	Carbone 13 ^{13}C	$^{16}\text{O}(p, ^4\text{He})^{13}\text{N}$ (cyclotron)	Chimie organique	$^{13}\text{NH}_3$ utilisé pour marquer des acides aminés
Oxygène 15 ^{15}O	2,03 min	$\beta+$ (99,9), EC (0,1)	1720	2,5	Azote 15 ^{15}N	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ (cyclotron)	Chimie en phase gazeuse rapide	^{15}O H ₂ O utilisé pour visualiser le flux sanguin cérébral ou myocardique
Iode 124 ^{124}I	4,18 j	$\beta+$ (25), EC (75)	2140	3,48	Tellure 64 ^{64}Te	$^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ (cyclotron)	Chimie organique	Marquage de macromolécules comme l'insuline ou encore de l'annexin V, marqueur de l'apoptose
Cuivre 64 ^{64}Cu	12,7 h	$\beta+$ (18), $\beta-$ (37), EC (45)	655	0,64	$\beta+$, CE : Nickel 64 ^{64}Ni $\beta-$: Zinc 64 ^{64}Zn	$^{nat}\text{Ni}(p,x)^{64}\text{Cu}$ (cyclotron)	Chimie de chélation	^{64}Cu -ATSM : traceur de l'hypoxie tumorale
Gallium 68 ^{68}Ga	68,3 min	$\beta+$ (90), EC (10)	1900	3,48	Zinc 68 ^{68}Zn	^{68}Ge - ^{68}Ga (Générateur)	Chimie de chélation	Analogues de la somatostatine (DOTA-TOC, DOTA-TATE)
Zirconium 89 ^{89}Zr	3,3 j	$\beta+$ (23), EC (77)	897	1 mm	Yttrium 89 ^{89}Y	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ (cyclotron)	Chimie de chélation	^{89}Zr -trastuzumab, anticorps ayant une affinité pour les récepteurs HER2

Tableau 2 : Principaux radioéléments utilisés en TEP (Disselhorst et al., 2010), (Paans, 1997), (Vercouillie, 2014), (Walther et al., 2011), (Li and Conti, 2010)

Ces radionucléides présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes :

- La demi-vie, ou période radioactive, temps au bout duquel la moitié des noyaux du radioisotope se désintègrent, est un premier paramètre à prendre en compte. En effet, concernant la production tout d'abord, un radioisotope à demi-vie courte, comme l' ^{15}O ou le ^{11}C , devra être produit directement sur le lieu d'utilisation par transmutation nucléaire à l'aide de cyclotrons biomédicaux dédiés avant leur incorporation dans le MRP final, puis, leur purification, formulation, et contrôle qualité. Afin d'obtenir le MRP en quantité suffisante, les radiosynthèses mises en œuvre pour le préparer, devront comporter le minimum d'étapes chimiques, comme contrainte supplémentaire, à chaque étape chimique, le rendement devra être le plus élevé possible dans le temps le plus bref. Les quantités de radioisotopes engagées pour préparer ce MRP seront élevées, ce qui est important à prendre en compte en termes de radioprotection (Dollé, 2012). La demi-vie aura également une incidence sur le choix du vecteur. Pour marquer un anticorps par exemple, le temps que mettra l'anticorps à atteindre sa cible devra être inférieur à la demi-vie du radioélément. Ainsi, pour le marquage d'une molécule vectrice avec un radioisotope de courte demi-vie, celle-ci devra avoir une cinétique rapide. Certains radioéléments ne seront donc pas adaptés au suivi de processus biologiques *in vivo* sur du long terme (Vercouillie, 2014 ; Wolfs et al., 2015).
- Le mode de désintégration du radioélément est, aussi, à prendre en compte. Si celui-ci ne se désintègre pas de manière pure, il peut alors produire d'autres rayonnements : des photons X d'énergies variables dûs au réarrangement électronique (en cas de capture électronique, EC), des électrons Auger (EC), ou encore des électrons émis par désintégration β^- (cas du ^{64}Cu), tous ces éléments étant à l'origine d'une augmentation de l'irradiation du patient. Les rayonnements photoniques autres peuvent être à l'origine d'une dégradation de la qualité de l'image.
- L'énergie maximale de la particule β^+ ($E_{\beta^+\text{max}}$), influe sur le parcours moyen de ces particules dans la matière. En effet, plus cette énergie sera importante, plus le parcours de la particule β^+ sera long. Ce parcours sera d'autant plus long que la densité du tissu traversé sera faible. L'analyse du signal consiste en la détection simultanée des deux rayons γ de 511keV permettant de localiser le lieu de l'annihilation, et non celui de l'émission de la particule β^+ . Il existe, alors, une erreur de localisation du lieu réel d'émission du positron qui est à l'origine d'une diminution de la résolution spatiale (Sanchez-Crespo, 2013). Pour le fluor, cette erreur est de 0,62mm.
- La production du radioisotope pourra être réalisée à l'aide d'un cyclotron, ou le radioélément sera extrait d'un générateur.



- Enfin, les caractéristiques chimiques du radioélément ont aussi leur importance. Les halogènes (fluor, iode) ainsi que le carbone, l'azote ou l'oxygène, sont des molécules à faible encombrement stériques. Ils seront donc plus facilement incorporés dans des molécules biologiques en ayant peu, voire, aucune influence sur leurs propriétés biochimiques.

Pour marquer une molécule avec des éléments métalliques comme le cuivre ou le gallium, la fixation devra se faire par l'intermédiaire d'un chélate, un cycle de 5 à 6 atomes qui exercera un « effet de pince » autour de l'atome métallique central. L'ajout d'un chélate, ayant un fort encombrement stérique, peut entraîner des modifications du profil pharmacologique de la molécule vectrice. L'ajout d'une chaîne permettant d'espacer la molécule d'intérêt du chélate peut s'avérer nécessaire afin que le site actif de la molécule d'intérêt ne soit pas trop encombré. Ce type de marquage ne se fait que pour des molécules de haut poids moléculaire (D'Hardemare, 2014), (Vercouillie, 2014).

I.1.3.2 Utilisation de cette technique pour l'imagerie de cellules greffées

Cette technique d'imagerie utilisant les rayonnements ionisants peut être utilisée pour le suivi de cellules transplantées. Le processus de radiomarquage peut être réalisé ici de manière directe ou indirecte (Wolfs et al., 2015).

Comme il a été vu précédemment, lors d'un marquage direct, le traceur est incorporé ou greffé aux cellules par incubation *in vitro* avant leur administration au sujet (Cf. Figures 6 et 7).

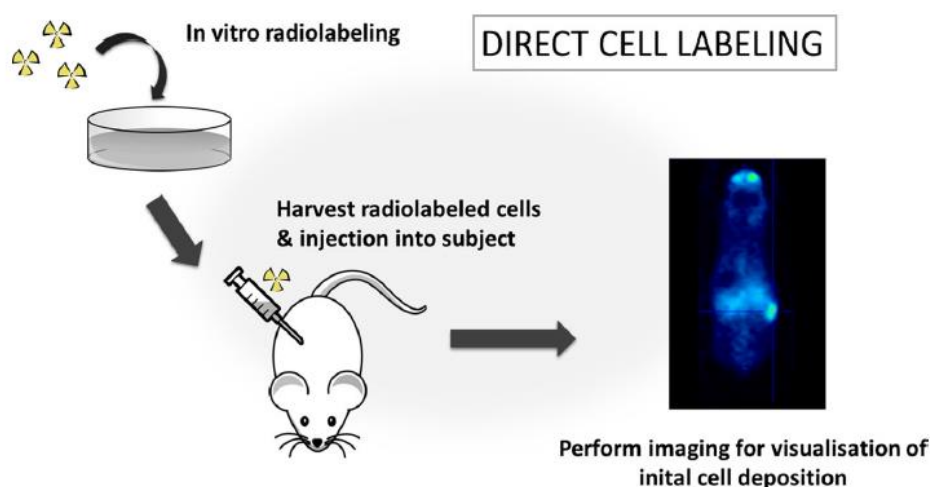


Figure 6 : Radiomarquage direct (Wolfs et al., 2015)

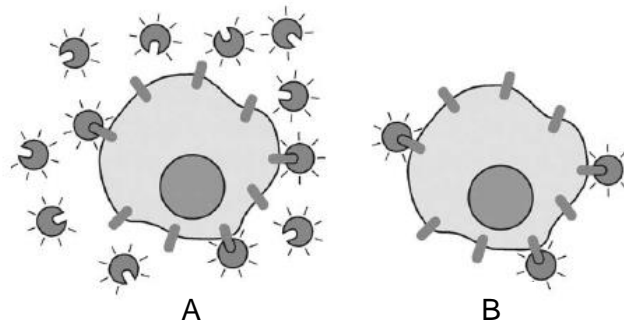


Figure 7 : Illustration du marquage direct au niveau cellulaire : immédiatement après l'injection de traceur (A), et quelques heures après (B) (Herschman, 2004)

Le traceur peut être incorporé dans les cellules via un mécanisme de transport actif ou passif (ex : [^{18}F]-FDG), il peut aussi diffuser librement à travers la membrane cellulaire (ex : [^{111}In]-oxine), ou encore se lier à l'extérieur de celle-ci (ex : [^{18}F]-HFB). Cette technique de marquage a l'avantage de permettre la visualisation d'un petit nombre de cellules. De plus, elle ne requiert aucune manipulation génétique et constitue donc une technique de marquage simple. Néanmoins, elle présente certains inconvénients comme la dilution du signal en cas de division cellulaire si l'isotope choisi est à demi-vie longue, la perte du traceur par les cellules au cours du temps, ou l'impossibilité de continuer le suivi des cellules après la décroissance du radioisotope (Wolfs et al., 2015).

Le marquage indirect quant à lui est basé sur l'introduction d'un gène rapporteur à l'intérieur des cellules que l'on souhaite suivre. Ce gène sera ensuite transcrit puis traduit en protéine ayant une affinité pour une sonde radiomarquée.

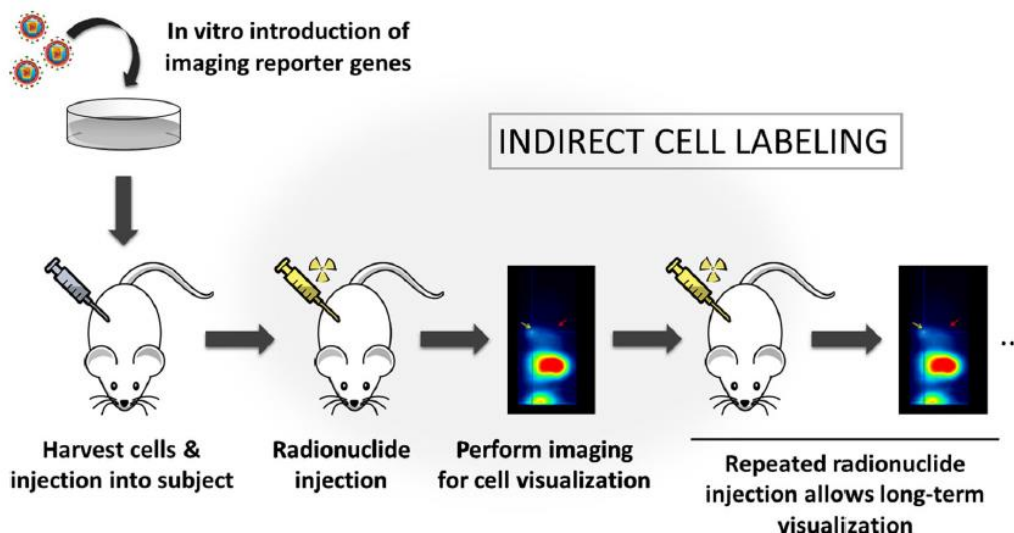


Figure 8 : Radiomarquage indirect (Wolfs et al., 2015)

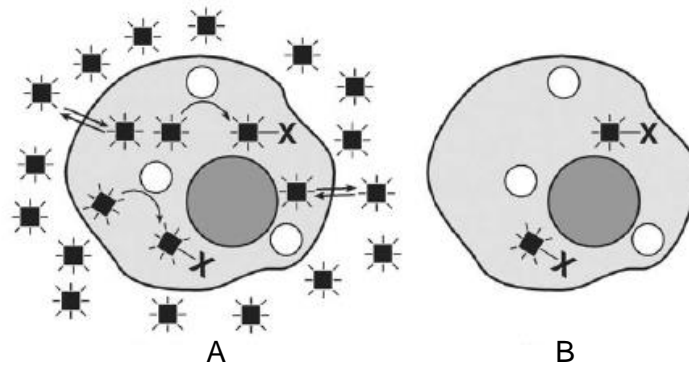


Figure 9 : Illustration du radiomarquage indirect : juste après l'injection du traceur (A), et quelques heures après (B) (Herschman, 2004)

Ici, le signal émis est directement lié à une activité cellulaire, donc lié à la viabilité des cellules que l'on désire suivre. La transcription du transgène peut être contrôlée par un promoteur particulier permettant la transcription uniquement dans des conditions prédéfinies. Dans cette approche, les cellules greffées sont marquées *in situ* et évaluées de façon répétitive (suivi longitudinal) en utilisant les techniques d'imagerie nucléaire avec une grande sensibilité et des sondes de courte demi-vie (Paterson et al., 2011). Cependant, cette technique requiert la manipulation de matériel génétique, ce qui implique certaines précautions. De plus, au cours du temps, le transgène peut être rejeté par la cellule ou inactivé.

I.2. Les gènes rapporteurs

I.2.1. Principe

Un gène rapporteur, est un gène dont le produit d'expression peut être mesuré. Cette mesure peut permettre de connaître ainsi le niveau d'expression d'un autre gène, ou donner une information sur la viabilité de la cellule. Un système rapporteur est construit grâce à un plasmide recombinant, contenant le gène thérapeutique d'intérêt et le gène rapporteur. Cet ADN est ensuite transféré à l'intérieur de cellules cibles où il sera ensuite transcrit, puis, traduit en protéines. La transcription et la traduction du gène d'intérêt et du gène rapporteur se faisant en même temps, en mesurant l'activité de la protéine issue du gène rapporteur, il est possible de déduire l'expression du gène thérapeutique d'intérêt. Lorsque l'on ne souhaite pas faire exprimer un gène thérapeutique dans une cellule, mais simplement savoir si cette cellule est vivante, un plasmide contenant uniquement un gène rapporteur suffit. Les premiers gènes rapporteurs utilisés codaient pour des protéines telles que la β -galactosidase, la phosphatase alcaline, la luciférase ou la GFP, mais la mesure du niveau d'expression de ces protéines nécessite souvent des échantillons tissulaires. L'expérimentation *in vivo* chez l'animal requiert des techniques non invasives, répétibles et reproductibles comme la TEP. C'est la raison pour laquelle de nouveaux gènes rapporteurs permettant l'obtention d'un signal mesurable par imagerie nucléaire ont été développés (Kang and Chung, 2008).

I.2.2. Techniques d'incorporation d'un transgène, choix du vecteur

La transfection, est l'introduction d'ADN, d'ARN, ou d'oligonucléotides dans une cellule eucaryote (Sokolova and Epple, 2008). Un ADN nu ne peut pas traverser la membrane cellulaire. En effet, l'ADN étant une molécule anionique, hydrophile et de masse moléculaire très élevée, il ne constitue pas une molécule propice au passage des membranes biologiques. Ainsi, l'introduction d'ADN dans une cellule nécessite des techniques physiques fragilisant les membranes cellulaires ou des systèmes de transferts de gènes (Al-Dosari and Gao, 2009). Ces systèmes sont appelés des vecteurs. Idéalement, un vecteur doit pouvoir s'associer à la cellule de manière spécifique ou non, et pénétrer dans le cytoplasme, soit par fusion directe avec la membrane plasmique, soit après rupture de vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes). Enfin, il devra permettre l'entrée de l'ADN dans le noyau, soit par les pores nucléaires, soit en profitant de la division cellulaire car l'enveloppe nucléaire se désagrège durant cette phase. On distingue la transfection transitoire, au cours de laquelle l'ADN ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte, et la transfection stable, au cours de laquelle il y a intégration chromosomique et transmission de cet ADN à la génération suivante (Sokolova and Epple, 2008). Il existe 2 types de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux.

I.2.2.1 Transfert de gènes par l'intermédiaire de vecteurs viraux

Les virus, particules microscopiques constituées d'ADN ou d'ARN englobées dans une capsid de protéines, sont capables d'entrer dans les cellules de mammifères et d'y intégrer leur génome. C'est cette propriété que l'on a cherché à exploiter afin d'en faire des vecteurs. Ces virus vecteurs doivent subir avant tout une étape de désarmement (suppression de la partie du génome responsable de la réplication) (Bonnin, 2014).

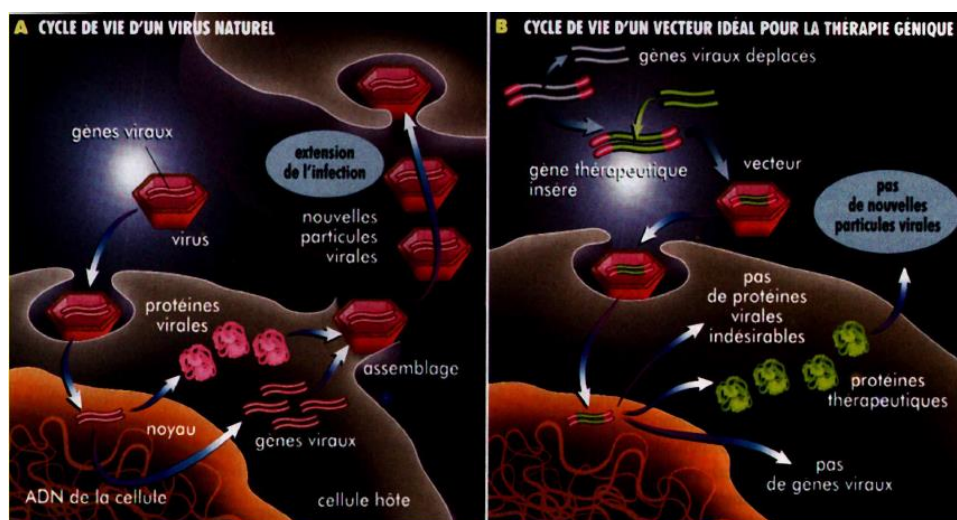


Figure 10 : Principe d'un vecteur viral (Pitard, 2014)

Il existe plusieurs types de vecteurs viraux présentés dans le tableau suivant :

	Vecteurs rétroviraux	Vecteurs adénoviraux	Vecteurs « adeno-associated virus » (AAV)	Vecteur du virus de l'herpès
Taille maximale du transgène	8 kilobases (kb)	35 kb	4,8 kb	30 kb
Cellules cibles	Seulement en division active	En division active ou ne se divisant pas	En division, ou probablement ne se divisant pas	En division active ou ne se divisant pas
Administration	<i>Ex vivo</i> ou <i>in situ</i>	<i>Ex vivo</i> ou <i>in situ</i>	Inconnue, probablement seulement <i>ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i> ou <i>in situ</i>
Expression du gène d'intérêt	Stable	Transitoire	Inconnue, probablement stable	Transitoire
Taux d'expression du gène d'intérêt	Modéré	Elevé	Modéré	Modéré
Risques	Intégration probablement mutagène	Réactions inflammatoires et immunitaires	Intégration probablement mutagène	Neurotoxicité mal caractérisée, intégration probablement mutagène

Tableau 3 : Atouts et limites des vecteurs viraux (Pitard, 2014)

La taille du transgène que l'on souhaite incorporer sera limitée par la taille de la capsid. Bien que très efficaces, ces vecteurs présentent tout de même quelques inconvénients : leur immunogénicité, leur cytotoxicité, et le risque d'intégration mutagène dans le génome. En effet, une intégration chromosomique ectopique d'ADN viral peut empêcher l'expression d'un gène suppresseur de tumeur ou encore activer un oncogène, conduisant à la transformation des cellules en cellules malignes (Ramamoorth and Narvekar, 2015). Leur production étant coûteuse et leur stockage difficile, il existe un intérêt grandissant pour les techniques de transfert de gènes n'ayant pas recours à des vecteurs viraux (Bonnin, 2014).

1.2.2.2 Techniques de transfert de gènes n'utilisant pas de vecteurs viraux

1.2.2.2.1. Méthodes physiques

De nombreuses méthodes physiques de transfert de gènes ont été investiguées. Ces méthodes facilitent le transfert de gènes du milieu extracellulaire jusqu'au noyau en créant des trous/défauts de membrane transitoires en utilisant des forces physiques comme les pulsations électriques ou encore les ultrasons (Al-Dosari and Gao, 2009). Les principales méthodes physiques sont résumées dans le tableau suivant :



Technique	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
Transfert d'ADN nu	Endocytose	Sécurité, simple à mettre en œuvre	Très faible efficacité
Bombardement de particules ou gene gun	ADN recouvert de particules de métaux lourds bombardées sur les cellules	Précision de la dose d'ADN, faible cytotoxicité, bonne efficacité, flexibilité	Faible pénétration
Electroporation	Augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire	Bonne efficacité, répétable, simple à mettre en œuvre	Endommagement des cellules possible, nécessité d'une grande quantité d'ADN
Sonoporation	Augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire	Sécurité, flexibilité	Faible efficacité
Magnétofection	Pinocytose et endocytose (couplage du gène avec nanoparticules magnétiques)	Flexibilité, faible cytotoxicité	Transfection transitoire

Tableau 4 : Méthodes physiques de transfert de gènes (Ramamoorth and Narvekar, 2015)

I.2.2.2. Méthodes chimiques ou vecteurs synthétiques

Il existe 3 principales catégories de vecteurs chimiques : les particules inorganiques, les lipides cationiques, et les polymères cationiques. Les lipides et les polymères cationiques sont capables de former des complexes avec les molécules d'ADN chargées négativement par le biais d'interactions électrostatiques. Ces complexes protègent l'ADN et facilitent son internalisation intracellulaire (Al-Dosari and Gao, 2009).

Lipides cationiques : La membrane cellulaire étant principalement constituée de lipides et phospholipides, les vecteurs lipidiques ont une tendance naturelle à interagir avec celle-ci pour faciliter la captation cellulaire des molécules d'ADN ou d'ARN (Pathak et al., 2011). Le transfert de gènes médié par des liposomes cationiques ou lipofection est la méthode de transfert n'utilisant pas les vecteurs viraux la plus utilisée. Ces lipides présentent la structure suivante : une tête hydrophile, chargée positivement, reliée à une queue hydrophobe. Dans un milieu aqueux, les lipides cationiques vont s'organiser de façon à ce que la partie hydrophile se trouve en surface, tandis que les parties hydrophobes vont s'assembler entre elles en bicouches lipidiques pour former une structure de liposome. La tête hydrophile chargée positivement, est capable de se lier avec les groupements phosphates des acides nucléiques pour former une structure unique compacte appelée lipoplexe. Les charges positives à l'extérieur des lipoplexes sont à l'origine d'interactions électrostatiques entre ces derniers, et les glycoprotéines et protéoglycanes de la membrane plasmique des cellules. Cela facilite la captation intracellulaire des acides nucléiques (Al-Dosari and Gao, 2009). L'efficacité de transfection dépend de la structure du lipide (forme géométrique globale, nombre de groupes chargés par molécule, etc...), du ratio ADN-lipides, et des propriétés du colipide (lipide

additionnel présent au sein du lipoplexe qui participe à l'entrée du gène dans le cytoplasme) (Wasungu and Hoekstra, 2006). Ce transfert d'ADN à l'intérieur d'une cellule grâce à ce type de vecteur est illustré Figure 11.

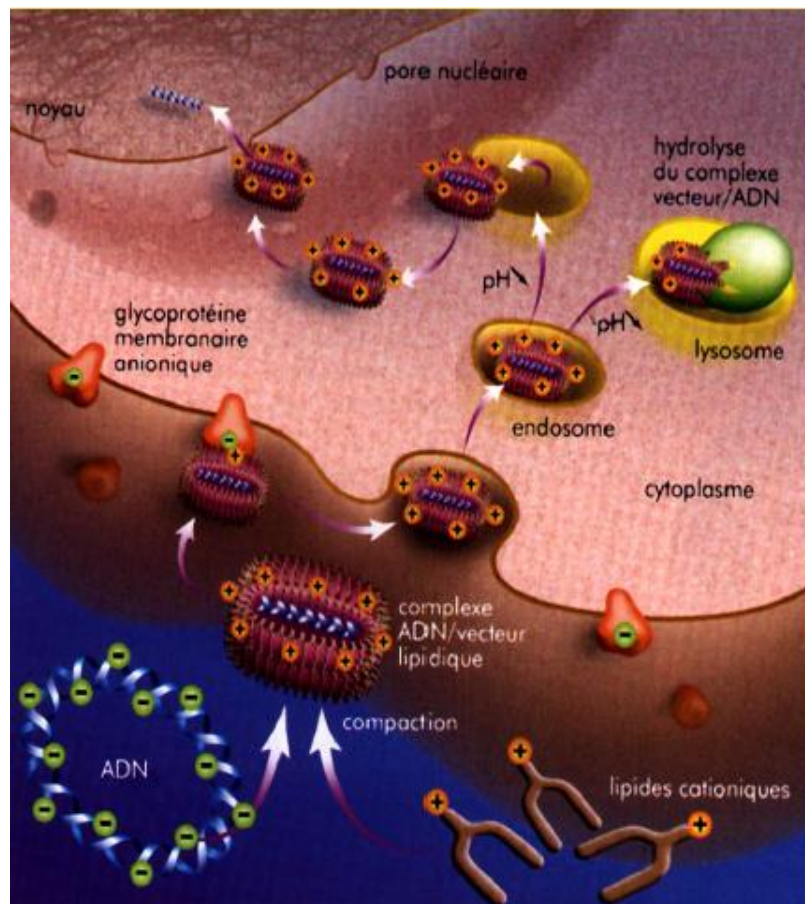


Figure 11 : Transfert d'ADN dans une cellule par l'intermédiaire d'un vecteur non viral composé de lipides cationiques (Pitard, 2014)

Ces lipides cationiques entourant le matériel génétique permettent de le protéger des nucléases intra et extracellulaires. Les obstacles majeurs à l'usage de ces lipides cationiques sont leur cytotoxicité, qui apparaît au-delà d'un ratio de 3 : 1 (lipides : ADN) (Ramamoorth and Narvekar, 2015), et la courte durée d'expression du gène. Ils peuvent également induire une réponse inflammatoire chez l'hôte participant à la toxicité et à la durée raccourcie de l'expression génique. Des délétions, ainsi que des mutations sur des séquences CpG au niveau des plasmides d'ADN, ont généré des résultats prometteurs en supprimant la production de cytokines après l'administration de lipoplexes (Yew et al., 2000).

Polymères cationiques : Les polymères les plus utilisés pour le transfert de gènes sont la poly-L-lysine, la poly-L-ornithine, la polyéthylénimine (PEI), le chitosan et les dendrimères (Ramamoorth and Narvekar, 2015). Lorsqu'ils sont mis en contact avec de l'ADN, les polymères cationiques forment des complexes de taille nanométrique appelés polyplexes. Ces polyplexes sont plus stables que les lipoplexes, et sont classés en 2 catégories : ceux d'origine

naturelle, et les synthétiques. Parmi les polymères synthétiques, le PEI est l'un des plus utilisés. Il s'agit d'un polymère riche en groupements amine non protonés au pH physiologique. Cette dernière caractéristique est à l'origine de « l'effet éponge » qui, une fois que le polyplexe a été endocyté, neutralise l'acidité à l'intérieur de l'endosome, en captant les ions H⁺ qui y pénètrent par un mécanisme de transport actif membranaire. Ceci entraîne alors un influx d'ions chlore, à l'origine d'une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de l'endosome qui gonfle et finit par se rompre. Le PEI est efficace *in vitro* et *in vivo*, cependant il présente une forte toxicité, notamment, à cause du PEI libre restant après la formation des complexes avec l'ADN. Ainsi, des polymères biodégradables moins toxiques et plus efficaces ont été mis au point. De nombreuses améliorations de ces polyplexes sont en cours d'étude afin de diminuer d'avantage cette cytotoxicité (Al-Dosari and Gao, 2009).

Nanoparticules inorganiques : Ces nanoparticules peuvent être préparées à partir de métaux (or, argent, fer...), de sels inorganiques, ou céramiques (phosphate ou carbonate de calcium, magnésium, silice...) (Sokolova and Epple, 2008). Les plus utilisées pour le transfert de gènes sont les nanoparticules magnétiques, les nanotubes de carbone, et les nanoparticules de silice mesoporeuses. La liaison de l'ADN à ces nanoparticules se fait grâce à la fonctionnalisation de leur surface avec des groupements ou des molécules capables d'interagir avec l'ADN. Bien qu'elles montrent une efficacité de transfection modérée, ces nanoparticules possèdent plusieurs avantages par rapport aux particules organiques : simples à mettre en œuvre, faible toxicité, et bonne stabilité pour le stockage. Toutefois, l'ADN étant adsorbé à la surface de ces particules, il peut être facilement dégradé par les nucléases. Cet ADN doit donc être protégé d'une dégradation prématurée à l'intérieur des cellules ce qui fait l'objet de plusieurs études (Sokolova and Epple, 2008).

I.2.3. Eléments d'un plasmide

Un plasmide est une molécule d'ADN double brin, circulaire, présente dans les bactéries de façon extra-chromosomique. Les plasmides sont capables de se répliquer de façon autonome. Ils possèdent leur propre origine de réplication et se répliquent de manière indépendante du chromosome bactérien. N'étant pas indispensables au métabolisme de leur hôte dans des conditions normales de croissance, leur fonction peut parfois être inconnue. Par des expériences de recombinaison *in vitro*, on sait intégrer dans un plasmide un fragment d'ADN provenant d'une autre source. On obtient ainsi, un plasmide recombinant, que l'on peut utiliser comme vecteur de clonage, d'expression, ou encore pour la transformation de cellules eucaryotes. Un plasmide utilisé comme vecteur d'expression eucaryote devra intégrer : un promoteur eucaryote, suivi du gène d'intérêt, d'un marqueur de sélection (gène de résistance

à un antibiotique par exemple), et d'un signal polyA de terminaison de transcription (Bonnin, 2014). Lorsque l'on souhaite faire exprimer un gène à une cellule de façon durable, la contrainte majeure réside dans le niveau et la durée d'expression du transgène. Elle dépend de l'efficacité du transfert de gène (choix du vecteur), mais également du plasmide lui-même (structure du squelette, taille). En effet, en thérapie génique, il est connu que l'expression d'un gène étranger par une cellule eucaryote peut rapidement s'arrêter. Plusieurs études ont montré que les promoteurs viraux sont rapidement inactivés (Löser et al., 1998 ; Gill et al., 2001). Il a été démontré aussi que ce phénomène était, en partie, dû à la méthylation des îlots CpG présents dans la séquence du promoteur viral (Brooks et al., 2004 ; Herbst et al., 2012). Un îlot CpG, est un segment d'ADN de 2 nucléotides : une cytosine suivie d'une guanine. Chez les mammifères, la méthylation de la cytosine d'un îlot CpG au sein d'un gène peut inactiver ce dernier. Ce phénomène réduit fortement l'efficacité et la longévité de l'expression du transgène et pourrait par conséquent limiter le suivi longitudinal des cellules greffées par imagerie moléculaire. Plusieurs études ont montré que l'utilisation d'une séquence d'ADN sans îlots CpG et d'un promoteur de mammifères (Hyde et al., 2008), (Bazzani et al., 2016) peut augmenter l'expression à long terme du transgène.

I.2.4. Différents gènes rapporteurs utilisés en TEP

Les gènes rapporteurs, utilisés avec des sondes radioactives visualisables en TEP, permettent l'imagerie non-invasive de l'expression d'un transgène chez l'homme. Les sondes utilisées, révèlent l'expression de leur gène rapporteur, en s'accumulant à la surface, ou à l'intérieur des cellules exprimant le gène (Yaghoubi et al., 2012). Ces gènes rapporteurs sont classés en trois catégories : ceux codant pour une enzyme, ceux codant pour un transporteur et ceux codant pour un récepteur (Cf. Figure 12) (Tjuvajev et al., 1995 ; Gambhir et al., 1999 ; Sanjiv S. Gambhir et al., 2000).



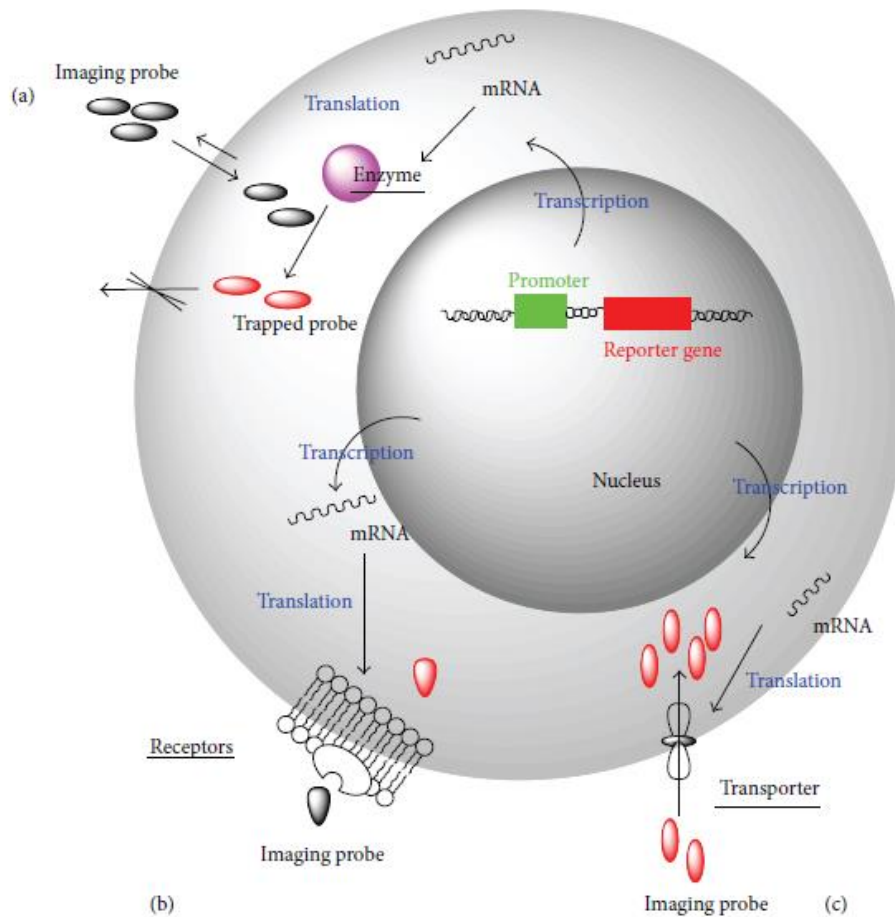


Figure 12 : Illustration schématique de l'expression de 3 types de gènes rapporteurs utilisés en médecine nucléaire (Chao et al., 2013)

I.2.4.1 Gènes codant pour un récepteur

La sonde n'a pas à traverser la membrane cellulaire et peut se lier directement au récepteur à la surface de la cellule. Cependant, il faut pour cela que le récepteur soit situé sur la membrane cellulaire, et qu'un seul ligand soit capable de s'y lier. Le signal ne pouvant pas être amplifié, le ligand (la sonde) devra avoir une très haute affinité pour le récepteur (Wolfs et al., 2015).

Prenons comme exemple le gène codant pour le récepteur 2 de la dopamine (D_2R). Ce récepteur est naturellement présent dans le cerveau au niveau du striatum et de la glande pituitaire. Il s'agit d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, capable d'activer une protéine G (Strange, 1990). Il peut être imagé, grâce à des sondes capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), telles que la [^{18}F]-fluoroethylspiperone ([^{18}F]-FESP), ou le [^{11}C]raclopride (Wolfs et al., 2015). Les études quantitatives *in vivo* et *in vitro* d'accumulation de ces traceurs à la surface des cellules hépatiques exprimant le D_2R , ont démontré une corrélation, entre la radioactivité accumulée dans les tissus cibles et le niveau d'expression de ce gène (Sanjiv S. Gambhir et al., 2000). Cependant, il existe une importante expression endogène de ce récepteur, responsable d'un bruit de fond élevé, particulièrement

au niveau du striatum. De plus, la dopamine endogène étant capable de s'y lier, une compétition peut avoir lieu entre celle-ci et le radioligand. Enfin, la liaison d'un ligand à ce récepteur peut conduire à une modulation du niveau d'AMPc, et ainsi, à une activation de la cascade de signalisation en aval, ce qui constitue un autre inconvénient (Deroose et al., 2009). Un mutant du D₂R a ainsi été mis au point, dans lequel la liaison du ligand n'est pas couplée à l'activation de la cascade de signalisation (Liang et al., 2001). Le D₂R étant un gène humain, il n'induit pas de réponse immune contre les cellules qui l'expriment. Il a donc été utilisé dans de nombreuses applications en tant que deuxième gène rapporteur, conjugué à un autre gène rapporteur comme l'HSV1-tk ou le hNIS (Wolfs et al., 2015).

Le récepteur aux estrogènes est aussi utilisé comme gène rapporteur en TEP, sa sonde est un dérivé fluoré de l'estradiol (Furukawa et al., 2006).

1.2.4.2 Gènes codant pour un transporteur

Ces transporteurs sont transloqués au niveau de la membrane cellulaire après leur expression et sont capables de transporter leur sonde spécifique vers l'intérieur de la cellule.

Un exemple de ce type de gène est le symporteur de l'iode et du sodium humain hNIS. Ce symporteur permet aux ions iodure d'entrer à l'intérieur des cellules thyroïdiennes. L'absorption de ces ions iodure est couplée à celle de deux ions sodium, utilisant ainsi le gradient électrochimique des cations sodium à travers la membrane plasmique. Ce gène a été identifié en 1996 (Dai et al., 1996) chez le rat, et le NIS humain (hNIS) a ensuite été isolé et cloné (Smanik et al., 1996). Son expression par des cellules dont on cherche à assurer le suivi, leur permet ainsi de concentrer des ions iodure radioactifs à partir du plasma (Kang and Chung, 2008). D'autres ions comme ClO₃⁻, SCN⁻, SeCN⁻, NO₃⁻, Br⁻, BF₄⁻, IO₄⁻ et BrO₃⁻, mais également des radionucléides comme le technétium 99 (^{99m}TcO₄⁻) et le rhénium 188/186, ont une affinité pour ce transporteur (Van Sande et al., 2003 ; Chung, 2002). hNIS étant physiologiquement exprimé chez l'homme, il est peu immunogène, et sa faible expression endogène dans un nombre limité de tissus est responsable d'un faible bruit de fond (Wolfs et al., 2015). Il n'y a pas d'organification des ions I⁻ captés par des cellules non thyroïdiennes. Les autres radioisotopes substrats de ce transporteur ne sont pas non plus retenus par les cellules qui l'expriment, par conséquent, un relargage du traceur peut avoir lieu. Cependant, dans des masses tissulaires de taille importante comme les tumeurs, les ions relargués peuvent être captés par les cellules environnantes, le signal restant ainsi au sein de la masse à visualiser pendant une longue période (Schipper et al., 2003). Malgré ce relargage, hNIS demeure un gène rapporteur très utilisé.

I.2.4.3 Gènes codant pour une enzyme

Les enzymes sont capables de métaboliser des sondes spécifiques radiomarquées conduisant à leur accumulation dans le cytoplasme. Par conséquent, seules les cellules exprimant cette enzyme pourront stocker la sonde. Un avantage majeur de ce type de gènes rapporteurs est le fait qu'une même enzyme est capable de métaboliser plusieurs molécules de traceur entraînant leur accumulation, et ainsi, une amplification du signal (Deroose et al., 2009).

Le gène de l'*herpes simplex virus type 1* [HSV1] thymidine kinase (TK), HSV1-tk, est celui qui demeure le plus étudié. Ce gène est d'abord transcrit en HSV1-tk ARNm puis traduit en TK. Cette thymidine kinase est capable de phosphoryler deux types de substrats : les dérivés pyrimidines comme la [¹²⁴I]-FIAU et la [¹²⁴I]-FEAU (qui peut aussi être marquée avec du ¹⁸F), et les dérivés acycloguanosine comme la [¹⁸F]-FHPG (dérivé du ganciclovir) ou encore la [¹⁸F]-FHBG (dérivé du penciclovir) (Kang and Chung, 2008). Lorsqu'une cellule exprime l'HSV1-tk, ces substrats peuvent être phosphorylés sous forme de monophosphates et s'accumuler à l'intérieur de celle-ci, ce qui permet de la visualiser (Cf. Figure 13) (Gambhir et al., 1999). Ce gène a tout d'abord été utilisé comme gène suicide en cancérologie (Oldfield et al., 1993), c'est-à-dire un gène capable d'entraîner une toxicité sélective dirigée contre les cellules dans lesquelles il est exprimé. Dans le cas présent, l'expression de l'HSV1-tk par une cellule la rend vulnérable au ganciclovir. Ce gène rapporteur a ensuite été utilisé dans des protocoles d'imagerie moléculaire permettant ainsi de visualiser l'expression de gènes thérapeutiques (S. S. Gambhir et al., 2000), ou la survie de cellules dans le cadre de greffes. Plusieurs types de cellules greffées ont pu ainsi être suivies avec cette technique : des cellules souches myocardiques (Wu et al., 2003 ; Qiao et al., 2009), des cellules mésenchymateuses (Lee et al., 2009), des cellules hématopoïétiques (McCracken et al., 2013), ou encore des cellules nerveuses (Daadi et al., 2013).

Il existe également une version mutée de ce gène, l'HSV1-*sr39tk*, permettant une expression de l'enzyme plus importante et phosphorylant préférentiellement les dérivés acycloguanosine. Ce mutant augmente ainsi grandement la sensibilité de cet outil. Ce gène a été mis au point par une équipe de Stanford afin de réduire la limite de détection de la TK (Sanjiv S. Gambhir et al., 2000). La combinaison de ce gène muté et de la [¹⁸F]-FHBG a été décrite comme le système le plus efficace en TEP (Herschman, 2004).



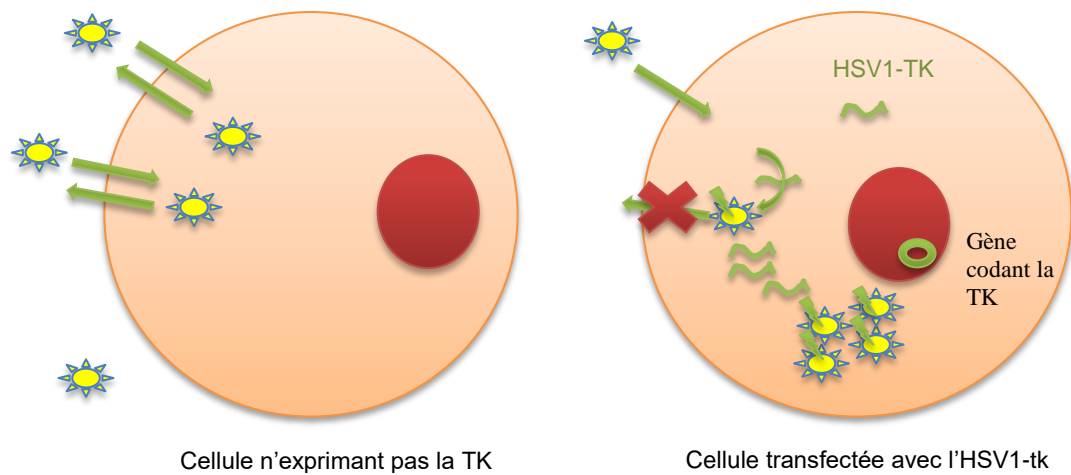
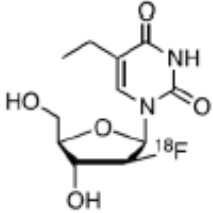
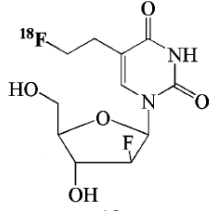
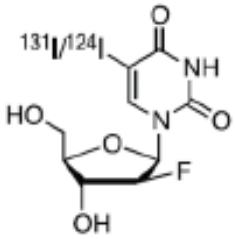


Figure 13 : Transcription d'un gène rapporteur et captation intracellulaire d'une sonde moléculaire

I.3. Différentes sondes visualisables par TEP utilisées avec l'HSV1-tk :

Il existe différentes sondes permettant de visualiser l'expression du gène HSV1-tk. Ces sondes sont des dérivés de pyrimidines ou d'acycloguanoses comme le ganciclovir ou le penciclovir, marquées avec des radioisotopes visualisables par imagerie TEP comme l'iode 124 (^{124}I) ou le fluor 18 (^{18}F). Elles sont résumées dans le Tableau 5.

Traceur	Structure	Synthèse	Particularités	Passage de la BHE
<p>[¹⁸F]-FEAU ou 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-ethyluridine</p> <p>[¹⁸F]-FFEAU ou (1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-(2-fluoroethyl)uridine</p> <p>Analogues fluoré de la thymidine</p>	<p>[¹⁸F]-FEAU :</p>  <p>(Müller et al., 2013)</p> <p>[¹⁸F]-FFEAU :</p>  <p>(Balatoni et al., 2005)</p>	<p>Complexe +++</p> <p>Nombreuses étapes ne pouvant pas toutes être réalisées dans le même réacteur. La synthèse nécessite donc un automate comportant au moins 2 réacteurs contenus dans un bloc chauffant (Tjuvajev et al., 2002) (Balatoni et al., 2005)</p>	<p>(Chin et al., 2008) : étude de la captation de la [¹⁸F]-FEAU comparée à d'autres traceurs fluorés par des cellules de gliome de rat C6 exprimant HSV1-tk ou HSV1-sr39tk.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Très bonne captation</u> de la [¹⁸F]-FEAU par des cellules exprimant HSV1-tk ou HSV1-sr39tk (p<0,05). La fixation de la [¹⁸F]-FEAU est plus importante que celle de la [¹⁸F]-FHBG dans les cellules exprimant l'HSV1-tk (p<0,05). • <u>Moins de fixation non spécifique</u> au niveau digestif que la [¹⁸F]-FHBG (clairance rénale prédominante). <p>(Miyagawa et al., 2008) : étude de captation de différents traceurs sur des cellules de gliome de rat RG2 exprimant HSV1-tk</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Très bonne sélectivité et sensibilité</u> de la [¹⁸F]-FEAU et de la [¹⁸F]-FFEAU par rapport à la FIAU 	<p>(Miyagawa et al., 2008) :</p> <p>[¹⁸F]-FEAU : Log D = -0,082 ± 0,002</p> <p>[¹⁸F]-FFEAU : Log D = -0,30 ± 0,01</p> <p>→ Mauvais passage de la BHE</p>
<p>[¹²⁴I]-FIAU ou (1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodouridine</p> <p>Analogue de la thymidine</p>	 <p>(Müller et al., 2013)</p>	<p>Simple</p> <p>Mais la production d'¹²⁴I à l'aide d'un cyclotron nécessite une source d'oxyde de ¹²⁴Te et doit être suivie d'une distillation sèche à 740°C (Jacobs et al., 2001)</p>	<p>(Miyagawa et al., 2008) : étude de captation de différents traceurs sur des cellules de gliome de rat RG2 exprimant HSV1-tk</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2h après injection du traceur, le rapport entre la radioactivité des cellules exprimant l'HSV1-tk et les sauvages est 3 fois supérieur avec la [¹⁸F]-FEAU et la [¹⁸F]-FFEAU qu'avec la FIAU (p<0,0001). Ce ratio était plus élevé après 24h pour le FIAU → <u>possibilité de réaliser les acquisitions bien plus tard qu'avec les traceurs fluorés</u> • <u>Fixation non spécifique dans l'estomac</u> 	<p>(Miyagawa et al., 2008) :</p> <p>Log D = -0,096 ± 0,001</p> <p>→ Mauvais passage de la BHE</p>

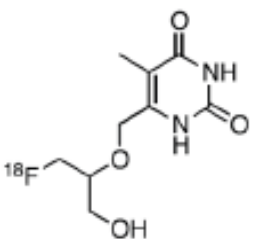
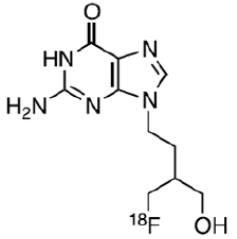
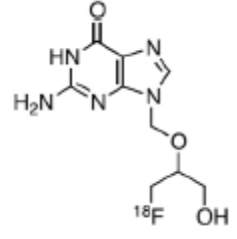
<p>[¹⁸F]-FHOMP ou 6-((1-[¹⁸F]-fluoro-3-hydroxypropan-2-yloxy)methyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione</p> <p>Dérivé acycloguanosine dont la structure est très proche du ganciclovir</p>	 <p>(Müller et al., 2013)</p>	<p>Simple</p> <p>Marquage direct du précurseur via la substitution nucléophile d'un groupement tosylate par un atome de ¹⁸F suivie d'une hydrolyse acide des groupements protecteurs.</p>	<p>(Müller et al., 2013) : comparaison de l'accumulation de [¹⁸F]-FHOMP dans des cellules HEK293 (<i>human embryonic kidney</i>) exprimant ou non l'HSV1-tk avec celle de la [¹⁸F]-FHBG, prise comme référence.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Très bonne captation</u> par les cellules exprimant la TK. <i>In vitro</i>, le <u>ratio radioactivité des cellules TK+/cellules témoins est beaucoup plus important avec la [¹⁸F]-FHOMP</u> qu'avec la [¹⁸F]-FHBG, car il est moins capté par les cellules témoins que la [¹⁸F]-FHBG. Cependant, <i>in vivo</i>, ce ratio est plus important pour la [¹⁸F]-FHBG. 	<p>(Müller et al., 2013) :</p> <p>Log D = -0.87 ± 0.03</p> <p>Cependant, il peut pénétrer dans le cerveau grâce à un transporteur particulier : ENT1.</p>
<p>[¹⁸F]-FHBG ou 9-(4-[¹⁸F]-fluoro-3-(hydroxyméthyl)butyl)guanine</p> <p>Dérivé du penciclovir</p> <p>[¹⁸F]-FHPG ou 9-((3-[¹⁸F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)méthyl)guanine</p> <p>Dérivé du ganciclovir</p>	<p>[¹⁸F]-FHBG :</p>  <p>(Müller et al., 2013)</p> <p>[¹⁸F]-FHPG :</p>  <p>(Müller et al., 2013)</p>	<p>Simple</p> <p>Même principe que la [¹⁸F]-FHOMP.</p>	<p>(Chin et al., 2008) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Phosphorylé plus efficacement</u> par l'HSV1-sr39tk <p>(Miyagawa et al., 2008) : étude de captation de différents traceurs sur des cellules de gliome de rat RG2 exprimant HSV1-tk</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Sensibilité et sélectivité plus faible</u> que le FEAU et FFEAU • <u>Fixation non spécifique importante au niveau abdominal</u> car son élimination se fait majoritairement par la voie hépatobiliaire. <p>(Alauddin and Conti, 1998) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Taux de phosphorylation par la TK de la [¹⁸F]-FHBG 12 fois supérieur à celui de la [¹⁸F]-FHPG</u> <p>(Müller et al., 2013)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Élimination rapide</u> ce qui explique un faible bruit de fond au niveau sanguin. 	<p>(Müller et al., 2013) :</p> <p>Log D = -0.87 ± 0.01</p> <p>→ Mauvais passage de la BHE</p>

Tableau 5 : Comparaison des différentes sondes utilisables pour visualiser l'expression de l'HSV1-tk

I.4. Problématique de l'exploration cérébrale

Pour assurer le suivi de cellules greffées dans le cerveau par imagerie moléculaire TEP *in vivo*, et plus généralement lorsqu'on veut faire de l'imagerie quantitative de certaines protéines cibles au niveau du système nerveux central (SNC), un certain nombre de règles sont à respecter. Le radiotraceur TEP idéal doit :

- Avoir une haute affinité et sensibilité pour sa cible,
- Etre capable de traverser la BHE,
- Ne pas être substrat des protéines d'efflux,
- Ne pas avoir de métabolites radioactifs responsables d'un signal non spécifique qui pourrait gêner sa visualisation,
- Avoir peu de sites de fixation non spécifiques,
- Une pharmacocinétique adaptée à la demi-vie du radioisotope avec lequel il est marqué (cinétique de captation et d'élimination observable),
- Pouvoir être marqué avec différents isotopes comme le ^{11}C ou le ^{18}F avec une haute activité spécifique,
- Pouvoir être administré à des doses traceuses sans risque (Pike, 2009).

La mesure de la concentration d'un radiotraceur dans le tissu nerveux se fait par le calcul de sa SUV (*standardized uptake value*), qui est le rapport entre la concentration en radioactivité dans un certain volume (Bq/mL), et la quantité de radioactivité injectée en fonction du poids du sujet. Une SUV de 1, correspond ainsi, à la concentration en radiotraceur résultant d'une distribution uniforme de la dose injectée dans tout l'organisme. Cette valeur peut être comparée entre les tissus et les différents radiotraceurs. Pour affirmer qu'un radiotraceur a une bonne diffusion cérébrale, une valeur maximale de SUV supérieure à 2 est souhaitable (Pike, 2009).

I.4.1. Capacité du radiotraceur à traverser la BHE

La capacité d'un radiotraceur à pénétrer dans le cerveau, dépend de son aptitude à traverser la BHE, et de sa susceptibilité aux phénomènes d'efflux (Pike, 2009).

La BHE est une barrière physiologique, présente dans le cerveau de tous les vertébrés, entre la circulation sanguine et le SNC. Il s'agit d'un système vasculaire, constitué de jonctions serrées, présentes entre les cellules endothéliales, de la lame basale contenant des pericytes, et des pieds astrocytaires (Rubin and Staddon, 1999) (Cf. Figure 14).



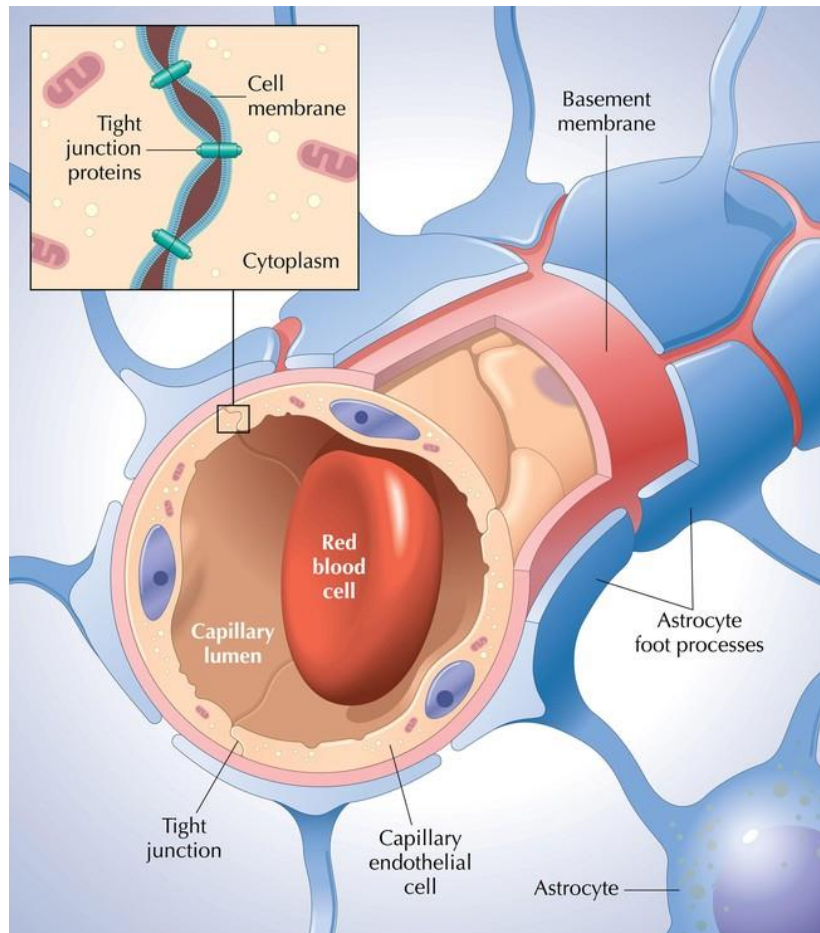


Figure 14 : Schémas de la barrière hémato-encéphalique et de ses différents constituants (“AP Bio The Blood Brain Barrier,” n.d.)

Il existe différents mécanismes de passage de la BHE :

- la diffusion passive, c’est le cas de certaines molécules lipophiles ;
- la diffusion facilitée, au moyen d’un transporteur protéique selon le gradient de concentration ;
- le transport actif, également grâce à un transporteur protéique mais qui nécessite une consommation d’énergie et se fait dans le sens inverse du gradient de concentration.

Les transporteurs protéiques étant peu nombreux et spécifiques de certaines petites molécules ou ions hydrosolubles, la majorité des médicaments passant la BHE le font par diffusion passive (Pham and Gimenez, 2001). Ceci explique que cette structure est très peu perméable aux molécules ionisées, hydrophiles, ayant un poids moléculaire important (Kroll and Neuwelt, 1998).



I.4.1.1 Transfert de médicaments au travers de la BHE par diffusion passive

Le passage d'une substance au travers de la BHE par diffusion passive, mode de transfert majoritaire pour les molécules exogènes, dépend de plusieurs facteurs, liés à l'état de la BHE, et aux propriétés pharmacologiques de la substance.

I.4.1.1.1. Facteurs physiologiques liés à la BHE

En l'absence d'altération de la BHE, la diffusion passive d'une molécule est fonction de la perméabilité membranaire. Cette dernière propriété est proportionnelle à la surface d'échange capillaire cérébrale et au coefficient de perméabilité cérébrale de la BHE et inversement proportionnelle au flux sanguin cérébral. Ainsi, lors d'une augmentation de débit sanguin, le temps de transit du médicament dans les capillaires cérébraux diminue, ce qui limite sa diffusion. A l'inverse, lors d'une diminution du débit sanguin, le temps de contact entre la molécule et l'endothélium des capillaires augmente permettant une augmentation de son transfert.

Certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou certaines tumeurs cérébrales peuvent modifier la perméabilité de la BHE permettant ainsi à certains médicaments de la traverser plus facilement (Pham and Gimenez, 2001).

I.4.1.1.2. Facteurs liés à la molécule

I.4.1.1.2.1. Etat d'ionisation

La majorité des médicaments étant des acides ou des bases faibles, ils sont sous forme ionisée ou non en fonction du pH du milieu. Or, seule la forme non ionisée peut pénétrer la BHE. La fraction non ionisée d'un composé peut être déterminée en fonction de son pKa et du pH du milieu, selon l'équation d'Henderson-Hasselbach (Pham and Gimenez, 2001).

I.4.1.1.2.2. Le poids et le volume moléculaire

Le passage de la BHE est inversement proportionnel à la masse moléculaire. Il a été observé que pour traverser la BHE, une molécule devait avoir un poids moléculaire inférieur à 500Da, et être capable de former moins de 8-10 liaisons hydrogène avec le solvant qui l'entoure (Kamphorst et al., 2002). La perméabilité de la BHE est également fonction du volume des molécules : celle-ci est divisée par 100 lorsque l'aire de section de la molécule passe de 52 Angstroms² de diamètre (masse moléculaire de 200Da), à 105 Angstroms² (masse moléculaire 450Da) (Fischer et al., 1998). Ainsi, pour pouvoir diffuser au travers de la BHE, l'aire de section d'une molécule doit être inférieure à 80 Å².

Il est à noter que la limite de poids moléculaire est plus faible au niveau de la BHE qu'au niveau de la barrière hémato-liquidienne (sang-LCR) qui est de 5 000 Da. En effet, aucune protéine ne peut franchir la BHE, alors que l'on en retrouve au niveau du LCR (majoritairement des

protéines plasmatiques). La concentration de ces protéines au niveau du LCR est inversement proportionnelle au rayon moléculaire et donc à leur taille (Pham and Gimenez, 2001).

I.4.1.1.2.3. La lipophilie

La capacité d'une molécule à traverser la BHE est très fortement liée à sa lipophilie. Cette caractéristique s'évalue principalement par le $\text{Log}P$ dans lequel P est le coefficient de partage d'une molécule non ionisée entre une solution organique (n-octanol) et une solution aqueuse (eau). Le coefficient de distribution au pH physiologique de 7,4, entre ces deux phases (forme ionisée et forme non-ionisée) est appelé $D_{7,4}$ (Pike, 2009). Le $\text{Log}D_{7,4}$ est négatif pour les molécules hydrophiles, et positif pour les molécules lipophiles. Il a été observé que les radiotraceurs capables de traverser la BHE par diffusion passive ont une lipophilie modérée, c'est-à-dire un $\text{Log}D_{7,4}$ compris entre 2 et 3,5 (Waterhouse, 2003). Lorsque le $\text{Log}D$ est compris entre ces deux valeurs, le transfert cérébral du médicament dépend du débit sanguin et du coefficient de perméabilité cérébrale (van Bree et al., 1988). Exceptionnellement, il arrive que certains radiotraceurs ayant un $\text{Log}D_{7,4}$ inférieur ou supérieur à ces valeurs pénètrent facilement dans le cerveau, mais pour des raisons encore méconnues (Waterhouse, 2003). La capacité de passage d'une molécule au travers de la BHE n'est donc pas proportionnelle à sa lipophilie. Les radiotraceurs très lipophiles, donc très fortement liés aux protéines plasmatiques, ont une faible fraction libre diffusible. Cette forte lipophilie est également à l'origine d'un taux de liaison cérébrale aspécifique important. Ainsi, lors du développement de nouveaux radiotraceurs TEP cérébraux, ceux ayant une très forte lipophilie sont exclus (Pike, 2009).

I.4.1.1.2.4. Fixation aux protéines plasmatiques

Comme il a été vu précédemment, dans le plasma, seule la fraction libre d'un médicament (non fixée aux protéines plasmatiques) est susceptible de franchir la BHE. Cependant, cette hypothèse a été remise en question depuis quelques années par différentes études. Plusieurs hypothèses sont actuellement retenues, parmi lesquelles, la dissociation du complexe médicament-protéine dans la microcirculation cérébrale après liaison de la protéine sur un récepteur endothélial spécifique. Ainsi, l'extraction cérébrale accrue du médicament, s'expliquerait par les modifications conformationnelles de la protéine engendrées par sa fixation à l'endothélium (Pardridge, 1986).

I.4.1.1.2.5. Influence des protéines d'efflux

De nombreux radiotraceurs TEP sont substrat des protéines d'efflux, et particulièrement de la P-glycoprotéine (P-gp) (Elsinga et al., 2004), très présente au niveau de la BHE. D'une manière générale, les molécules substrats de la P-gp sont très lipophiles, chargées positivement à pH 7,4, et ont plusieurs fonctions aromatiques (Raub, 2006). Le degré de

restriction de la perméabilité cérébrale par les P-gp est ainsi fonction de la structure moléculaire du radiotracer (Syvänen et al., 2009). Ce degré de restriction varie aussi en fonction des espèces animales. De petites différences structurelles peuvent avoir ainsi un impact important et imprévisible sur la susceptibilité du radiotracer à être victime des protéines d'efflux, au sein d'une même espèce animale.

Les possibles conséquences de cette susceptibilité d'un radiotracer d'être efflué du cerveau sur la mesure de sa concentration au niveau de sa cible ne sont pas clarifiées. Il est généralement considéré que, l'effet des protéines d'efflux est le même dans toutes les régions du cerveau. Cependant, une étude a montré une hétérogénéité de distribution de la P-gp au sein de cerveaux de rats, à l'origine de modifications de captation d'un traceur (la [¹⁸F]MPPF), en fonction des régions (Laćan et al., 2008).

L'inhibition de la P-gp par certains médicaments, permettant d'augmenter la captation cérébrale de plusieurs radiotraceurs, a été étudiée chez le rat (Ishiwata et al., 2007) et le primate (Syvänen et al., 2009). La ciclosporine A est l'inhibiteur ayant été le plus utilisé, mais de par sa néphrotoxicité, il est peu utilisé à cette fin chez l'homme.

I.4.1.2 Transfert de médicaments au travers de la BHE par diffusion facilitée

La diffusion facilitée au travers d'une membrane se fait au moyen d'un transporteur protéique selon le gradient de concentration. Contrairement à la diffusion passive, ce type de transport est saturable.

Seules certaines substances endogènes, comme le glucose et quelques rares médicaments, sont transportés par diffusion facilitée (Pham and Gimenez, 2001).

I.4.1.3 Transfert de médicaments au travers de la BHE par transport actif

Le transport actif, se distingue du mécanisme de diffusion facilitée, par le fait qu'il nécessite de l'énergie pour déplacer un médicament d'une zone peu concentrée vers une zone plus concentrée au travers d'une membrane. Ce système de transport impose la liaison du substrat à un transporteur protéique membranaire. Très peu de médicaments bénéficient de ce type de transport (Pham and Gimenez, 2001).

I.4.2. Métabolisme du radiotracer

Un radiotracer cérébral idéal ne doit pas être métabolisé. Ceci n'étant pas toujours le cas, il est préférable que cette métabolisation ait lieu à l'extérieur du cerveau, et que les radiométabolites générés aient une faible aptitude à traverser la BHE. Ces métabolites ne pourront pas interagir avec la protéine cible ou d'autres cibles cérébrales et donner lieu à des erreurs d'interprétation du signal (Pike, 2009).



II. Problématique et hypothèses

Le but de cette étude étant de suivre la procédure de greffe intracérébrale et de quantifier les cellules injectées, nous avons choisi la TEP comme technique d'imagerie moléculaire. Il s'agit d'une technique d'imagerie moléculaire prometteuse, car elle est non invasive, hautement sensible et résolutive. Elle permet l'acquisition d'images en 3D, et est transférable en clinique.

Le marquage direct, ne permettant pas d'évaluer la viabilité cellulaire, nous nous sommes tournés vers une technique de marquage indirect, car le signal émis est directement lié à une activité cellulaire.

Il nous a ensuite fallu choisir un gène rapporteur dont le produit d'expression est visualisable en TEP. Nous nous sommes donc tournés vers l'HSV1-tk. Ce gène rapporteur a l'avantage d'avoir un signal cumulatif, car il permet l'accumulation du radiotraceur à l'intérieur de la cellule, qui n'est pas relargué, contrairement au ^{99m}Tc , substrat des transporteurs hNIS. Aucun dérivé substrat de l'HSV1tk ne passe la BHE si celle-ci n'est pas lésée. Il existe, cependant, des moyens d'ouvrir la BHE transitoirement comme les ultrasons (Yang et al., 2014), c'est pour cela que nous avons tout de même choisi l'HSV1-tk. Ce gène a été largement utilisé en tant que gène suicide en oncologie (Alauddin and Gelovani, 2010), mais aussi en tant que gène rapporteur pour le suivi longitudinal de cellules greffées chez l'animal, le plus souvent dans des modèles de gliome (Love et al., 2007 ; Miletic et al., 2007). Plus récemment, il a été utilisé chez l'homme, afin de suivre des lymphocytes T CD8+ greffés exprimant l'interleukine 13 et l'HSV1-tk avec de la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG, chez un patient présentant un glioblastome multiforme (Yaghoubi et al., 2009).

Parmi les sondes existantes permettant d'imager ce gène, nous avons opté pour la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG.

Il s'agit de la sonde révélant l'expression de l'HSV1-tk la plus connue et la plus utilisée, son précurseur de synthèse commercialisé par ABX est largement accessible, c'est aussi celle pour laquelle nous avons le plus de recul. Elle a, par ailleurs, été utilisée chez l'homme (Yaghoubi et al., 2001), et une équipe de l'Université de Stanford a déjà utilisé la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG afin d'observer des cellules nerveuses greffées avec de bons résultats (Daadi et al., 2013). Bien que la $[^{18}\text{F}]$ -FEAU et la $[^{18}\text{F}]$ -FFEAU soient bien captées par les cellules exprimant l'HSV1-tk, leur synthèse est complexe et difficile à mettre en œuvre. Nous n'avons pas non plus choisi le $[^{124}\text{I}]$ -FIAU, car il se désintègre par CE dans 75% des cas, et génère alors de nombreux photons X d'énergies variables pouvant détériorer la qualité de l'image, ainsi que des électrons Auger, responsables d'une augmentation de l'irradiation des cellules. Le $[^{18}\text{F}]$ -FHOMP était également un bon candidat, mais le précurseur de synthèse n'est pas disponible.

Dans cette étude, nous avons souhaité définir les meilleures conditions expérimentales, et étalonner *in vitro* notre technique de suivi des cellules greffées intracérébrales, par le biais du gène rapporteur HSV1-tk et de sa sonde, la [¹⁸F]-FHBG. Dans un second temps, nous avons voulu vérifier la faisabilité de cette méthode *in vivo*, pour le contrôle de greffe. Nous avons ainsi développé une lignée stable de cellules transfectées avec un plasmide composé d'ADNs sans îlots CpG, contenant le gène HSV1-tk, ayant une séquence mammifère optimisée sous le contrôle d'un promoteur EF1alpha. Nous avons ensuite réalisé une gamme de calibration, à l'aide de ces cellules préalablement incubées avec le radiotracer, puis imagé ces cellules en culture *in vitro*, et *in vivo* après injection chez des rats ayant au préalable subi une lésion cérébrale.



III. Validation de la captation de la [¹⁸F]-FHBG par des cellules exprimant l'HSV1-tk *in vitro*

III.1. Synthèse de la [¹⁸F]-FHBG

III.1.1. Généralités

III.1.1.1 Nomenclature

Nom chimique : 9-(4-[¹⁸F]fluoro-3-hydroxyméthylbutyl)guanine

Synonymes : [¹⁸F]-FHBG

III.1.1.2 Structure

Formule brute : C₁₀H₁₄O₂FN₅

Poids moléculaire : 254,25 g/moles



Figure 15 : Molécule de [¹⁸F]-FHBG

III.1.2. Principe général de la synthèse

La synthèse de la [¹⁸F]-FHBG se déroule de la manière suivante :

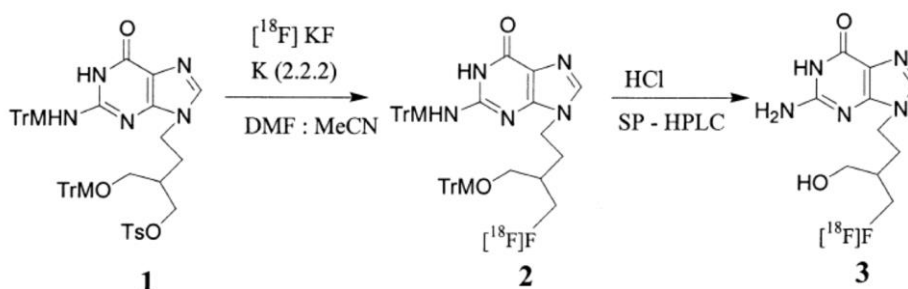


Figure 16 : Schéma de synthèse de la [¹⁸F]-FHBG (Ponde et al., 2004)

Il s'agit d'une synthèse en 2 étapes à partir d'un précurseur : la N², monométhoxytrityl-9-[4-(tosyl)-3-monométhoxytrityl-méthylbutyl]guanine (tosyl-FHBG) :

- la première étape est la substitution nucléophile d'un groupement tosylate (TsO) par un atome de ¹⁸F conduisant au N², monométhoxytrityl-9-[4-[¹⁸F]-3-monométhoxytrityl-méthylbutyl]guanine ;
- la deuxième étape consiste en l'hydrolyse acide des groupements protecteurs monométhoxytrityl permettant l'obtention du [¹⁸F]-FHBG (Ponde et al., 2004).

La synthèse de la [¹⁸F]-FHBG est basée sur une méthode similaire à celle décrite pour la préparation du [¹⁸F]-FMISO (fluoromisonidazole) (Pharmacopée européenne, 01/2014 ; n°2459, p 4517), elle a été réalisée conformément aux données de la littérature (Alauddin and Conti, 1998). Afin d'optimiser le rendement, plusieurs températures de substitution nucléophiles ont été testées : 90, 100, 105, 110, et 120°C.

III.1.3. Matières premières utilisées

Le fluor 18 (^{18}F) est produit au centre TEP du CHU de Toulouse grâce au cyclotron IBA 10-5 par la réaction nucléaire $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

Les autres matières premières utilisées pour la synthèse, la purification ainsi que la détermination de l'activité spécifique par HPLC, sont récapitulées en [Annexe 1.1](#).

III.1.4. Description du module de synthèse

Une fois synthétisée, la solution aqueuse de ^{18}F est transférée sous pression d'hélium vers l'entrée du module de synthèse. L'ensemble des manipulations ont été réalisées sur l'automate Synchron R&D® (Société Raytest GmbH, Straubenhardt, Allemagne ; Système de synthèse Nucléophile ^{18}F R&D) inséré dans une hotte blindée ventilée de classe A.

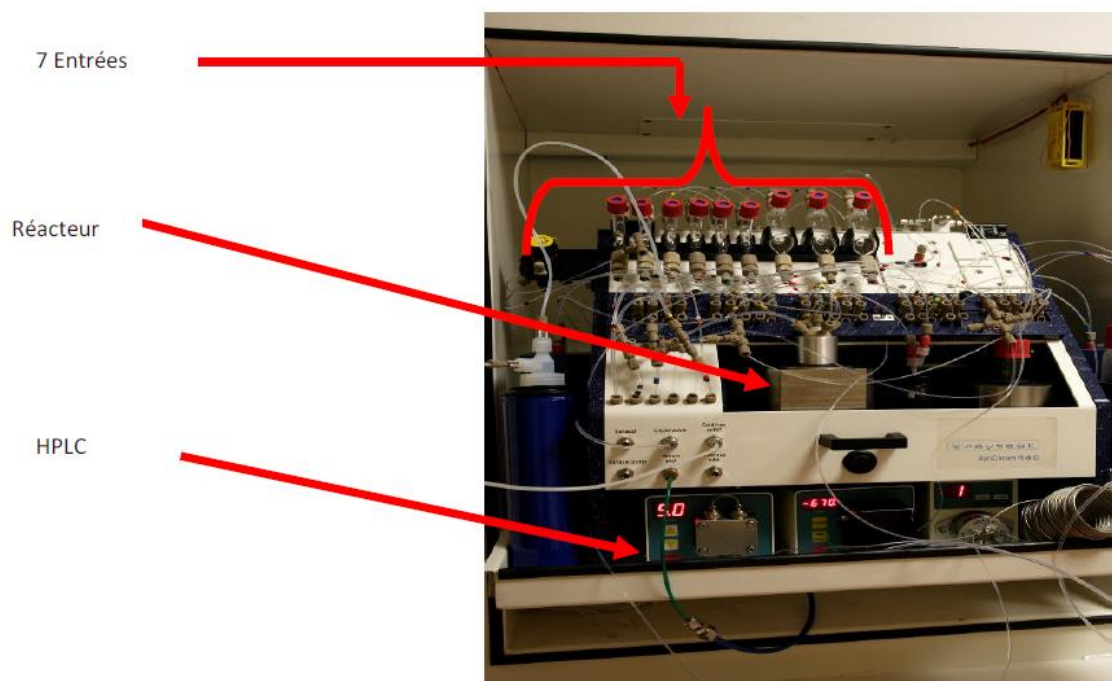


Figure 17 : Automate Synchron R&D

Ce système intègre une HPLC de type semi-préparative permettant la purification du composé, une fois la synthèse terminée. La boucle d'injection est de 10 mL, avec un détecteur UV (longueur d'onde : $\lambda = 254 \text{ nm}$) couplé à un détecteur de radioactivité (cristal $\text{NaI}(\text{TI})$). Nous utilisons une colonne C18 en phase inverse (Prontosil®, L 250mm, $\varnothing 10,0 \text{ mm}$, pores $5,0 \mu\text{m}$, Bischoff) et un solvant d'élution composé d'un mélange d'acétate de sodium et d'éthanol (90 : 10) à un débit de 2 mL/min.

L'interface graphique du module de synthèse est représentée en [Annexe 1.2](#).

III.1.5. Procédé de fabrication

L'ion fluorure $^{18}\text{F}^-$ étant une base extrêmement forte, produite à partir d'eau enrichie en oxygène 18, après la synthèse, on se trouve en présence de H-F, espèce peu réactive. La chimie du fluor se fait donc en milieu anhydre afin d'exalter la réactivité de l'anion, c'est pour cela que nous avons recours à un tel procédé de fabrication (schéma représenté en [Annexe 1.3](#)).

➤ Etapes 1-2 : Production du $[^{18}\text{F}]\text{fluor}$:

Bombardement d'une cible d'eau enrichie en ^{18}O (2.5mL de H_2^{18}O) par un faisceau de protons accélérés à une énergie de 10 MeV jusqu'à l'obtention de l'activité souhaitée. Les ions fluorures sont alors produits par la réaction nucléaire $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$. L'eau irradiée est ensuite transférée sous pression d'hélium, dans un flacon située au sein de l'enceinte blindée contenant l'automate de synthèse.

➤ Etapes 3-4 : Préparation du $[^{18}\text{F}]\text{fluor}$:

Après transfert, la solution irradiée passe au travers d'une résine échangeuse d'anions de type Sep-Pack Accell Plus QMA (résine $\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$) qui retient les ions fluorures. L'eau enrichie est alors récupérée. La QMA est ensuite éluée par un mélange de Kryptofix® (ou cryptand 222 / carbonate de potassium), et le mélange (Kryptofix/ K^+) et ions fluorures réactif est transféré dans le réacteur où il subira un séchage azéotropique. Nous avons choisi pour cette étape d'utiliser une température élevée (115 °) et d'y ajouter des flashes d'acétonitrile. Le point d'ébullition de celui-ci étant inférieur à celui de l'eau, son évaporation rapide aura tendance à entraîner le reste de molécules d'eau présentes dans le réacteur. Les produits d'évaporation sont ensuite recondensés dans un « cold trap » utilisant de l'azote liquide. On obtient alors un résidu de fluorures « anhydre ».

➤ Etape 5 : Marquage :

Après la dernière séquence de séchage, 4 mg de précurseur (tosyl-FHBG) préalablement solubilisé dans 1 mL d'ACN dry, est ajouté dans le réacteur. Celui-ci est ensuite chauffé pendant 20 minutes, durant lesquelles, se fera la substitution nucléophile du groupement tosylate par le $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Nous avons testé plusieurs températures de chauffe : 90°C, 100°C, 105°C, 110°C, ou 120°C.

➤ Etape 6 : Hydrolyse acide :

Après 20 minutes, 900 μL d'acide chlorhydrique (HCl) 1N sont ajoutés au mélange réactionnel, puis, le réacteur est à nouveau chauffé à 115°C pendant 5 minutes. C'est durant cette étape



que se fera l'hydrolyse des 2 groupements monométhoxytrityl permettant l'obtention du [^{18}F]-FHBG.

➤ Etape 7 : Neutralisation :

Après refroidissement du mélange réactionnel, 360 μL de soude (NaOH) 2N ainsi que 1 mL de citrate de sodium sont ajoutés afin de neutraliser l'HCl et de tamponner le milieu.

➤ Etapes 8 – 9 – 10 : Purification par HPLC :

Une purification par HPLC est réalisée sur colonne semi-préparative : le pic radioactif de [^{18}F]-FHBG est détecté après un temps de rétention de $17,52 \pm 0,05$ minutes (débit : 2 mL/min) et est ensuite collecté.

III.1.6. Optimisation de la synthèse

Afin d'optimiser le rendement de synthèse de la [^{18}F]-FHBG, nous avons fait varier la température de chauffage du réacteur lors de l'étape de substitution nucléophile. Les rendements de synthèse ont été déterminés à partir du radiochromatogramme obtenu après purification du composé par HPLC semi-préparative. Ils sont représentés en Figure 18.

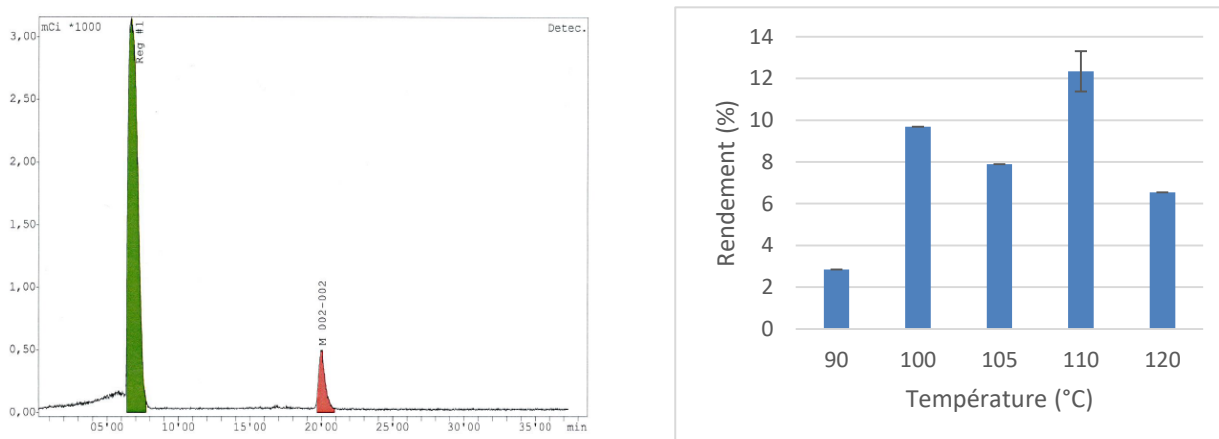


Figure 18 : Exemple de radiochromatogramme RA obtenu après purification par HPLC semi-préparative, pic 1=fluor libre et pic 2 = [^{18}F]-FHBG (à gauche), et rendements de synthèse de la [^{18}F]-FHBG en fonction de la température de substitution nucléophile (à droite).

La température ayant permis l'obtention du meilleur rendement (12%) est de 110°C . L'écart-type des rendements obtenus pour cette température est de 0,97 (pour les autres températures testées, nous n'avons réalisé qu'une seule synthèse). Ce rendement est comparable à celui atteint par Alauddin *et al* en 1998 (12%), et par Ponde *et al* en 2004 ($12 \pm 5\%$), alors que, dans cette dernière publication, la technique de chauffe du réacteur pour l'étape de substitution nucléophile utilisait les micro-ondes (Alauddin and Conti, 1998) (Ponde *et al.*, 2004). Après purification, l'activité moyenne synthétisée est de 1243 MBq. Le solvant d'éluion utilisé pour la purification étant un mélange d'acétate de sodium et d'éthanol (90:10), la quantité d'éthanol inférieure à 10% est compatible avec une mise en contact avec les

cellules, ainsi qu'avec une injection *in vivo*. Après dilution de la [¹⁸F]-FHBG dans le milieu de culture contenant les cellules afin d'étudier sa captation, le milieu contenait toujours moins de 0,001% d'éthanol.

III.1.7. Caractérisation du produit

L'activité spécifique ainsi que la limite de détection et de quantification de la [¹⁸F]-FHBG ont été déterminées par HPLC analytique, grâce à une colonne Luna C18 Phenomenex de dimensions : L 150 mm, ø 4,60 mm, pores 5,0 µm, avec une phase mobile constituée d'un mélange H₂O : CH₃CN (95 : 5) (débit : 1,5mL/min).

L'activité spécifique déterminée par HPLC analytique est supérieure à 3,2 GBq/µmoles. La quantité de [¹⁸F]-FHBG détectée sur le radiochromatogramme UV est inférieure à la limite de quantification de la méthode (déterminée par la mise au point d'une gamme étalon avec le [¹⁸F]-FHBG froid).

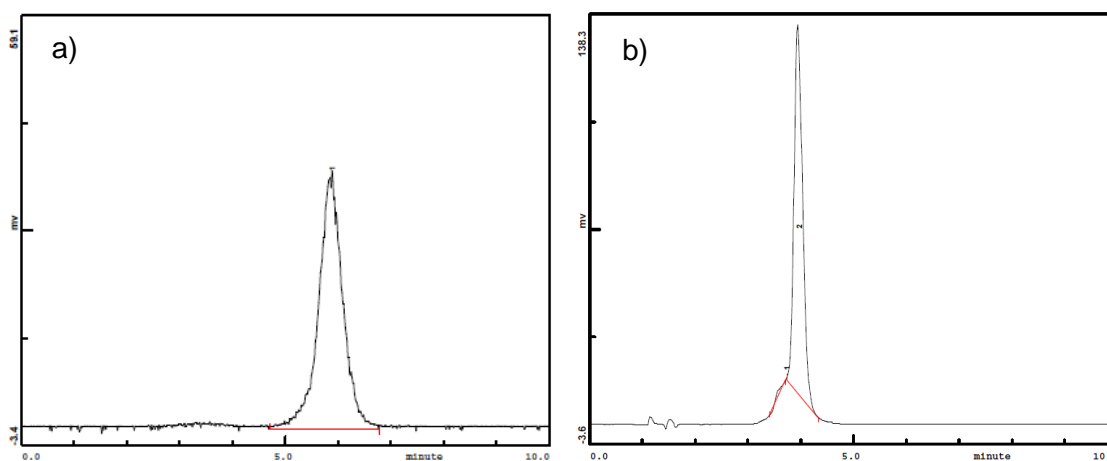


Figure 19 : Exemple de radiochromatogrammes en détection γ après injection de la [¹⁸F]-FHBG purifié (a) et en détection UV, avec co-injection de FHBG froid (b) obtenus sur colonne d'HPLC analytique

Lors de l'analyse HPLC, nous avons remarqué que le pic de [¹⁸F]-FHBG était précédé d'un autre pic ayant un temps de rétention quasi-identique. Il s'agit probablement d'une impureté de synthèse en très petite quantité ne pouvant pas être éliminée lors de la purification. Elle n'a pas été caractérisée. Son aire sous la courbe est inférieure à celle correspondant à la [¹⁸F]-FHBG et est inférieure à la limite de détection de notre méthode.

La PRC moyenne est de 100% et reste identique à t+4h après la radiosynthèse.

III.1.8. Mesure du coefficient de partage octanol/tampon 7,4

La détermination du $\text{Log}D_{7,4}$, qui caractérise la lipophilie de la molécule, a été réalisée selon le protocole de Zhao *et al* (Zhao et al., 2014). Dans un tube à hémolyse, 600µL de n-octanol (phase organique) ont été mélangés au vortex avec 600µL de tampon phosphate (0,025 mol/L,

pH 7,4) (phase aqueuse) et 0,37 MBq de [¹⁸F]-FHBG pendant 10 min. Le tube a ensuite été centrifugé à 14000 rpm pendant 5 min, et des aliquots de 500µL de chaque phase ont été placés dans un compteur γ (Perkin-Elmer® 1480Wizard 3). Après le comptage, les deux phases ont été mélangées au vortex une nouvelle fois, centrifugées, puis recomptées. Cette opération a été réalisée trois fois au total pour s'assurer que le rapport entre les cpm de la phase organique et aqueuse reste identique à chaque fois. Le log D a ensuite été calculé grâce à l'équation suivante :

$$\text{Log } D = \text{Log} \left(\frac{\text{cpm de la phase organique} - \text{bruit de fond}}{\text{cpm de la phase aqueuse} - \text{bruit de fond}} \right)$$

La valeur obtenue, calculée sur trois échantillons différents est égale à - 0,88. Cela signifie que la [¹⁸F]-FHBG est une molécule hydrophile. Ceci peut gêner son utilisation en neurologie, car son caractère hydrophile n'est pas un atout pour le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, comme il a été mentionné précédemment, le $\text{Log}D_{7,4}$ optimal permettant le passage de cette barrière pour une molécule, est situé entre 2 et 3,5 (Waterhouse, 2003). La biodistribution de la [¹⁸F]-FHBG a été étudiée par Yaghoubi *et al.* en 2001 (Yaghoubi *et al.*, 2001). Cette étude a montré une accumulation au niveau des intestins, de la vessie, du foie et des reins (qui sont les 2 organes responsables de son élimination), mais une absence de pénétration à travers la BHE, ce qui concorde avec nos résultats. Or, nous envisageons tout de même de l'utiliser pour la visualisation des cellules souches greffées car il est capable de traverser la BHE lorsque celle-ci est lésée. Ceci a d'ailleurs été fait par Daadi *et al* en 2013 dans le suivi longitudinal de cellules nerveuses greffées en post-AVC (Daadi *et al.*, 2013).

III.1.9. Etude de la métabolisation du [¹⁸F]-FHBG par les protéines plasmatiques :

Nous avons voulu ici tester la stabilité de notre molécule dans le plasma après une injection intraveineuse (IV). Cette étude de métabolisation a été réalisée en s'inspirant du protocole de Denholt *et al* (Denholt *et al.*, 2011). 500 µL de plasma ont été incubés avec 5550 kBq de radioligand à 37 °C durant 4 temps d'incubations : 5 min, 20 min, 1h, et 2h. Après incubation, les protéines ont été précipitées par addition de 500 µL d'ACN et chaque tube a ensuite été centrifugé 3 min à 14500 rpm. Chaque surnageant a ensuite été analysé par HPLC analytique. Les résultats obtenus après 5 min, 20 min, 1h ou 2h d'incubation sont représentés Tableau 6.



Durée d'incubation de la [¹⁸ F]-FHBG dans le plasma	[¹⁸ F]-FHBG		Métabolite	
	S (uV*s)	Q (%)	S (uV*s)	Q (%)
5 min	3423442	47	3887366	53
20 min	4403774	31	9980519	69
1h	428897	17	2120329	83
2h	3667996	10	34179494	90

Tableau 6 : Aires sous la courbe (S (uV*s)) et pourcentages de [¹⁸F]-FHBG et de son métabolite après 5 min, 20 min, 1h ou 2h d'incubation dans le plasma

On remarque qu'au fur et à mesure du temps, la quantité de [¹⁸F]-FHBG devient de plus en plus faible, alors que celle de son métabolite augmente. Notre traceur est donc très rapidement métabolisé. Cependant, la méthodologie utilisée comporte un biais temporel. En effet, la difficulté rencontrée lors de cette étude est que les protéines plasmatiques ont été précipitées à l'ACN et non dénaturées, ce qui n'a pas stoppé la métabolisation de notre molécule. Ainsi, il a fallu que nous injectons notre échantillon très rapidement dans la boucle HPLC après la précipitation et la centrifugation afin d'avoir des pics correspondant réellement à nos temps d'incubation. De plus, des résidus de protéines ont perturbé la migration du solvant d'élution au sein de la colonne HPLC, ce qui nous a conduit à faire varier le débit.

Il nous est donc impossible de conclure avec certitude à une métabolisation rapide de la [¹⁸F]-FHBG dans le plasma grâce à cette seule expérience de métabolisation. Les conditions ne sont pas optimales, d'autant plus qu'en 2001, Yaghoubi *et al* ont réalisé des dosages dans les urines de patients 2h après injection et l'ont retrouvé à plus de 80% sous forme non métabolisée. Il serait donc intéressant de réitérer cette expérience, cette fois, en séparant bien nos deux phases (précipité et surnageant) à la fin de la centrifugation. Le surnageant n'étant plus en contact avec les protéines, la dégradation de la [¹⁸F]-FHBG serait définitivement stoppée.

III.2. Génération d'une lignée stable de cellules Neuro2A exprimant la TK

III.2.1. Principe

Pour procéder au transfert de gènes, nous avons choisi un vecteur non viral composé de lipides cationiques. Le gène d'intérêt compris dans un plasmide ainsi que les lipides cationiques (Lipofectamine®) sont, tout d'abord, mis en suspension dans un milieu pauvre en sérum (Opti-MEM®). Ceci permet la formation de complexes ADN-lipofectamine qui sont, ensuite, mis en contact avec les cellules. Les complexes sont alors endocytés puis l'ADN est libéré dans le cytoplasme avant d'atteindre le noyau. L'entrée de l'ADN plasmidique à

l'intérieur du noyau ne se faisant que lorsque les cellules sont en division, les cellules doivent ensuite être incubées 24h à 37°C, afin de pouvoir se diviser et exprimer le transgène.

III.2.2. Protocole de transfection

Le vecteur d'expression de mammifère pCpGfree-HSV1-tk nous a été fourni par Invivogen (Toulouse). Il est représenté en Annexe 2.2. C'est un plasmide ne contenant pas d'îlots CpG, composé d'ADNc et contenant le gène HSV1-tk avec une séquence de mammifère optimisée. Cet ADNc est sous le contrôle d'un promoteur EF1alpha, et d'une région amplificatrice issue du cytomégalo virus murin qui permet une expression à taux élevé. Le plasmide a été amplifié grâce à la souche bactérienne appropriée aux plasmides CpGfree (*E. coli* GT115) et préparé en utilisant un kit sans endotoxines (Macherey-Nagel NucleoBond® Xtra Maxi EF) pour éviter la présence de potentiels contaminants inflammatoires.

Pour la réalisation de cette étude de faisabilité ; l'utilisation de ce couple HSV1-tk /FHBG dans le cas de greffe de cellules intracérébrales, nous avons choisi d'utiliser des cellules facilement cultivables afin d'obtenir rapidement des lignées transfectées en nombre suffisant pour réaliser les expérimentations. Les études préliminaires de captation cellulaire de la [¹⁸F]-FHBG ont donc été réalisées sur une lignée cellulaire cancéreuse, la lignée Neuro2A (cellules de neuroblastomes de souris). Les cellules de la lignée Neuro2A, qui sont des cellules adhérentes, sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) complété avec 10% de sérum bovin fœtal, et 1% de Penicillin/Streptomycin, et maintenues à 37 °C sous *atmosphère humide* contenant 5 % de CO₂. Ces cellules ont étéensemencées 24h avant la transfection afin d'atteindre un taux de confluence de 70-80%. En effet, une confluence trop élevée serait à l'origine d'une inhibition de contact et diminuerait ainsi l'efficacité de transfection. Le protocole sur lequel nous nous sommes basés figure en Annexe 2.1. Le kit de transfection (Lipofectamine LTX) utilisé provient de la société Life Technologies™.

III.2.3. Mise au point des conditions de transfection avec le gène de la *gfp*

Nous avons tout d'abord réalisé une première série d'essais, à l'aide d'un plasmide contenant le gène codant pour la *green fluorescent protein* (*gfp*). Le but de cet essai était, tout d'abord, de vérifier s'il était possible de modifier génétiquement nos lignées Neuro2A avec ce protocole, et dans un second temps de déterminer le rapport ADN/lipofectamine permettant l'obtention du meilleur taux de transfection. Le gène de la *gfp* (*green fluorescent protein*) code pour une protéine ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte lorsqu'elle est excitée par un rayonnement de 488 nm. Lorsqu'elle est exprimée par les cellules, elle témoigne donc de la transfection et permet la visualisation directe des cellules transfectées. 100 000 cellules Neuro2A ont été transfectées avec 1µg de plasmide (pNeoCpG 04gfpS_v01, Invivogen™)

en utilisant 2,5 ou 5 μL de lipofectamine. 24h après, les cellules ont été observées au microscope à fluorescence pour évaluer l'efficacité de transfection. A partir des images obtenues, les taux de transfection (pourcentage de cellules exprimant le transgène) ont été calculés grâce au logiciel ImageJ™.

24h après la transfection, les images de la Figure 20 ont été obtenues. Les taux de transfection calculés sont de 24,9% avec 2,5 μL de lipofectamine et de 34,7% avec 5 μL . Nous avons donc utilisé 5 μL de lipofectamine et 1 μg d'ADN pour les transfusions ultérieures.

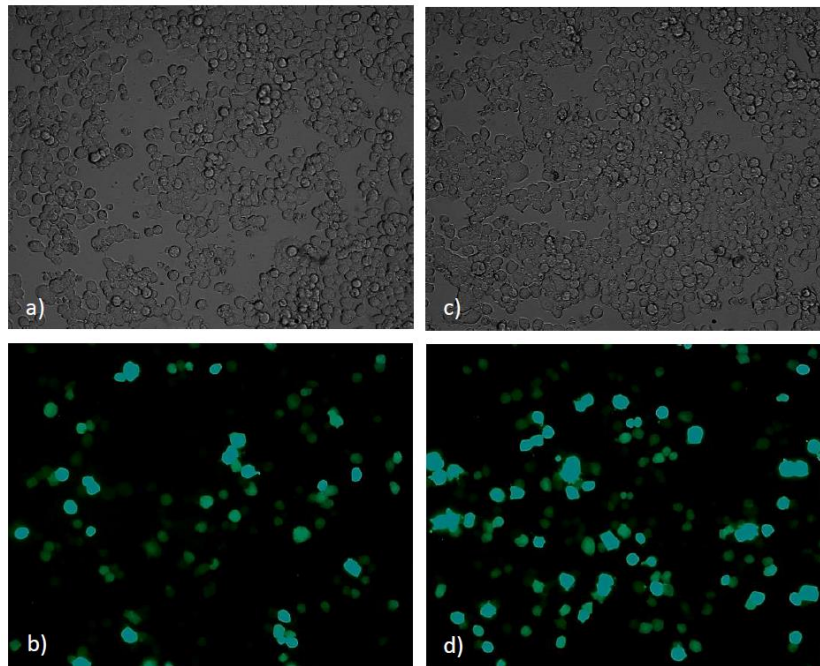


Figure 20 : Images au microscope à fluorescence en lumière visible (a, c) et en lumière UV (488 nm) (b, d) des lignées Neuro2A transfectées avec le gène de la gfp en utilisant 2,5 μL (a, b) ou 5 μL (c, d) de lipofectamine

Nous avons ensuite procédé à la transfection des lignées Neuro2A en utilisant une construction plasmidique similaire mais codant pour l'HSV1-tk (pNeoCpG 04HSVtkS_v01, Invivogen™). Le plasmide contient aussi un gène de résistance à la néomycine permettant la sélection des cellules.

III.2.4. Sélection de clones stables

Après la transfection, seul un certain pourcentage de cellules intègre le plasmide (taux de transfection). Cette intégration peut se faire de manière transitoire ou stable. En effet, après son passage dans le noyau, un plasmide peut être directement exprimé (transfection transitoire, phénomène le plus courant), ou intégré dans le génome de la cellule avant d'être exprimé (transfection stable, 2% des cas). Après transfection transitoire, les cellules, en se divisant, vont peu à peu perdre le plasmide, le niveau d'expression va donc diminuer progressivement. Ce phénomène ne pouvant donc pas permettre un suivi des cellules sur le

long terme, nous avons besoin de sélectionner les cellules ayant intégré de façon stable le plasmide. Pour cela, le plasmide utilisé contient, en plus de notre gène d'intérêt, un gène de résistance à un antibiotique (ici la néomycine). Ainsi, après transfection, la présence de néomycine dans le milieu de culture permettra pendant les premiers jours la sélection des cellules ayant intégré le plasmide de manière stable, ou transitoire, puis, des cellules l'ayant intégré de manière stable uniquement.

Pour connaître la concentration d'antibiotique nécessaire à la sélection de clones stables, nous avons réalisé une gamme de sensibilité : des cellules Neuro2a non transfectées ont été exposées à six concentrations de néomycine différentes : 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G418 ANT-GN1 Invivogen™), puis nous avons suivi leur évolution pendant une semaine. Le huitième jour, les cellules ont été incubées 10 min à température ambiante avec le kit LIVE/DEAD® Cell Assay de Live Technologies™ avant d'être observées au microscope à fluorescence. Ce test permet la discrimination rapide des cellules vivantes et mortes grâce à la *calcein-AM* qui devient fluorescente lorsqu'elle est transformée par les enzymes intracellulaires à activité estérase (fluorescence verte des cellules vivantes) et à un homodimère d'ethidium, agent intercalant de l'ADN qui ne pénètre dans les cellules qu'en cas de perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique (cellules mortes colorées en rouge). Nous avons ainsi pu choisir la plus faible concentration de néomycine ayant entraîné la mort de toute la population en 8 jours. Les résultats sont représentés sur les Figures 21 et 22.

Sur la Figure 21, on remarque qu'au fur et à mesure du temps, les cellules sont de moins en moins nombreuses et changent de forme. Ce phénomène est dû à la toxicité de l'antibiotique pour les cellules qui n'expriment pas le gène de résistance.

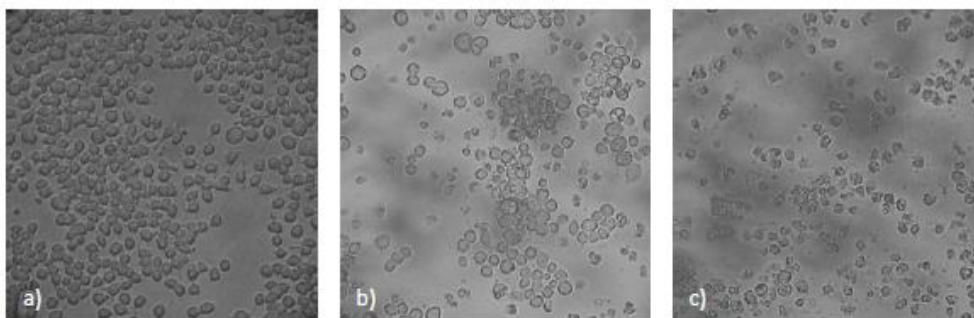


Figure 21 : Image au microscope des lignées Neuro2A ensemencées en présence de concentrations croissantes de néomycine à J0 (a), à J+5 avec 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de néomycine (b), et à J+5 avec 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de néomycine (c)



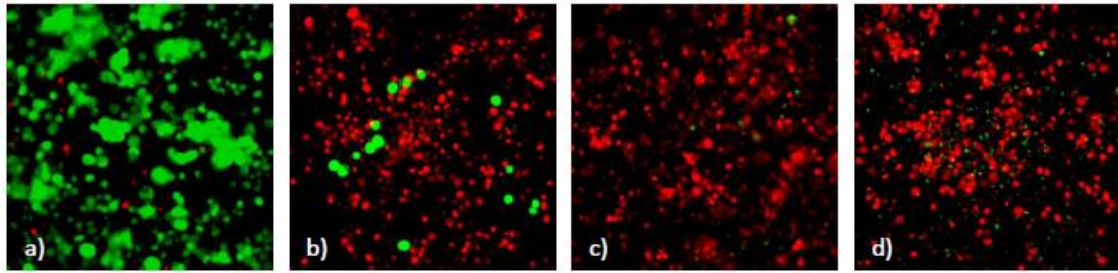


Figure 22 : Visualisation à J+8 au microscope à fluorescence des cellules vivantes (en vert) et des cellules mortes (en rouge) à des concentrations en néomycine égales à 200µg/mL(a), 400µg/mL(b), 600µg/mL(c), et 800µg/mL(d)

Les cellules étant toutes mortes avec 600µg/mL de néomycine, nous avons choisi cette concentration pour procéder à la sélection des clones.

Ainsi, la mise au point des conditions de transfection et de sensibilité à la néomycine, nous a permis de réaliser dans des conditions efficaces la transfection d'un plasmide codant pour la TK dans la lignée Neuro2A et de sélectionner des clones stables par addition de néomycine à 600µg/mL. Après sélection et amplification des clones pendant trois semaines, nous avons obtenu une population polyclonale de cellules Neuro2A exprimant la TK de façon stable, ce qui nous permet d'avoir un nombre de cellules illimitées pour pouvoir réaliser les études de captation.

Après l'étape de transfection, la concentration de néomycine retenue, a permis la sélection en trois semaines d'une population de clones stables résistants à la néomycine exprimant l'HSV1-tk sur lesquels nous avons réalisé les études de captation de la [¹⁸F]-FHBG.

III.3. Etude de la captation cellulaire de la [¹⁸F]-FHBG *in vitro*

III.3.1. Protocole global de l'étude

Les protocoles de ces études ont été réalisés à partir des travaux de Shahriar *et al* (Yaghoubi and Gambhir, 2006).

Nous avons comparé la captation de [¹⁸F]-FHBG par une population de clones stables exprimant la TK et par une population de cellules témoins non transfectées. Deux études ont été réalisées : la première en faisant varier le temps d'incubation des cellules en présence de [¹⁸F]-FHBG (Etude A), et la deuxième en faisant varier la quantité de cellules (Etude B), afin de calibrer notre technique.

Les comptages de radioactivité ont été réalisés à l'aide d'un compteur γ seul pour l'étude A, ou d'un compteur γ Perkin Helmer® Wizard™ 1480 et d'une caméra PET/CT Siemens® Biograph™ pour l'étude B.



III.3.1.1 Etude A

Pour tester différents temps d'incubation et quantités de [¹⁸F]-FHBG, 1 x 10⁶ cellules Neuro2A exprimant la TK et de cellules contrôles ont été ensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de 6 puits (surface : 9,6 cm²/puit), contenant 3 mL de milieu de culture. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Le lendemain, 115 ou 555 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG ont été ajoutés dans chaque puit et ainsi mis au contact soit de la population de cellules Neuro2A transfectées soit des cellules témoins non transfectées. Un schéma récapitulatif du plan d'expérience figure en [Annexe 3](#). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 1, 2 ou 3 heures.

Après incubation, le milieu contenant la [¹⁸F]-FHBG non captée par les cellules a été récupéré. Puis, les cellules ont été lavées trois fois 10 minutes avec 3 mL de milieu de culture avant d'être décrochées de leur support grâce à 1 mL trypsine, neutralisée ensuite par 2 mL de milieu afin d'être récupérées. Chaque fraction (milieu, trois lavages, cellules) de chaque puit a été récupérée afin d'être comptée (nombre de cpm) grâce au compteur γ.

Afin de calculer l'activité exacte déposée dans chaque puit, chaque quantité de [¹⁸F]-FHBG utilisée a été diluée au 1/100^e, et 3 mL de cette dilution ont ensuite été prélevés pour être comptés (cpm dilution). Les cônes ayant servi à pipeter la [¹⁸F]-FHBG, ont également été conservés et comptés (cpm restes). Le bruit de fond (BF) a été déterminé à partir de 3 mL de milieu de culture seul.

Ainsi, nous avons pu calculer le pourcentage de [¹⁸F]-FHBG captée par chaque population de cellules grâce au calcul suivant :

$$\text{Activité totale déposée} = \left(\frac{\text{cpm dilution} - BF}{3} \right) \times 100 - \text{cpm restes}$$
$$\% \text{ de captation} = \left(\frac{\text{cpm cellules} - BF}{\text{Activité totale déposée}} \right) \times 100$$

III.3.1.2 Etude B

III.3.1.2.1. Protocole

Dans cette expérience, nous avons utilisé plusieurs boîtes de culture (surface : 28,8 cm²) contenant chacune 5 x 10⁶ cellules exprimant la TK ou témoins dans 10 mL de milieu. Le lendemain, 555 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG ont été déposés dans chaque boîte. Après 3h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées 3 fois avec 10 mL de milieu avant d'être décrochées de leur support et récupérées de la même manière que dans l'expérience précédente.



Après centrifugation (10 min à 800 rpm) pour concentrer les cellules, le nombre de cellules présentes dans chaque boîte a été déterminé grâce à une cellule de Malassez. Différentes quantités (10 000, 50 000, 100 000, 250 000, 500 000, 1 ou 3×10^6 cellules) ont été, chacune, diluées dans 3 mL de milieu dans un tube à hémolyse et comptées, une à une, grâce au compteur γ , ou déposées dans des plaques de 96 puits avec 200 μ L de milieu et imagées grâce à la caméra TEP/CT.

Ces expériences ont été réalisées, chacune, sur 3 échantillons différents.

III.3.1.2.2. Acquisition des images grâce à la caméra TEP/CT

Les plaques de 96 puits, contenant les cellules marquées, ont été placées directement sous la caméra. L'acquisition a été réalisée en mode list sur une caméra TEP/CT pendant 15 min (5mm FWHM filtre Gaussien, 3 itérations, 21 sous-ensembles). Les images ont été automatiquement corrigées de la décroissance. Après reconstruction, les images obtenues par scanner ont été fusionnées aux images TEP.

III.3.1.2.3. Analyse des images et quantification

Le traitement des images reconstruites a été réalisé grâce au logiciel Sisyphé (Tensaouti et al., 2008). Les VOI (Volumes of Interest) ont été définis à partir des images TEP de la plaque de 96 puits contenant les cellules. Pour quantifier le signal de chaque VOI, le calcul suivant a été appliqué :

$$\text{Signal du VOI} = \text{activité moyenne du VOI} \times \text{volume du VOI} \times \text{rescale slope}$$

Ce signal a été converti en cpm pour chaque quantité de cellules utilisées.

Facteur de correction lié au logiciel.

Conversion en cpm pour pouvoir comparer avec compteur.

Afin de pouvoir comparer les expériences, des corrections de décroissance ont été appliquées pour ramener toutes les activités à 5h après le début de l'incubation des cellules avec la [18 F]-FHBG.

III.3.2. Résultats et discussion

III.3.2.1 Etude A

Le but de cette expérience était de visualiser l'effet du temps d'incubation sur la captation cellulaire de la [18 F]-FHBG, et donc, l'évolution du signal. Deux activités ont été testées : 115 et 555 kBq/mL, afin de déterminer si la dose pouvait être un facteur limitant. Les résultats sont présentés Figure 23.



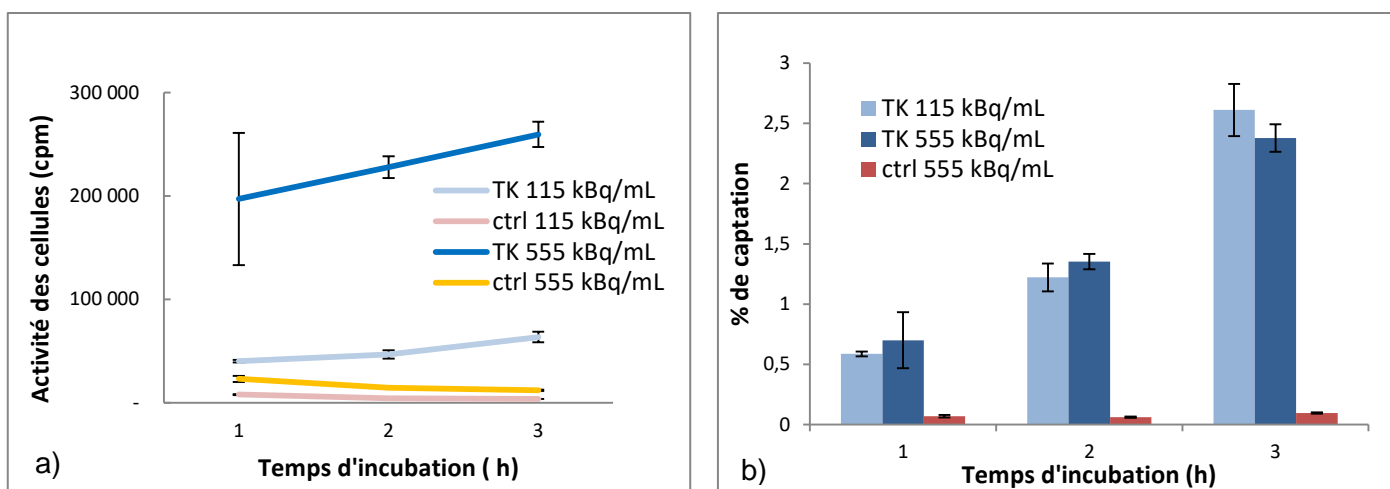


Figure 23 : Evolution de la radioactivité contenue dans les cellules, exprimée en coups par minute (a) ou en pourcentage de captation (b) en fonction de la durée d'incubation des cellules avec la [¹⁸F]-FHBG

La différence de captation cellulaire de la [¹⁸F]-FHBG entre les cellules exprimant la TK et les témoins est significative dès une heure d'incubation, quelle que soit la dose utilisée ($p < 0,001$). De plus, on remarque que, pendant l'intervalle d'une heure entre 1h et 2h d'incubation, ou entre 2h et 3h, le pourcentage de [¹⁸F]-FHBG captée par les cellules transfectées, est multiplié par 2, voire 2,5. Ainsi, entre 1h et 3h, le pourcentage de captation est multiplié par 5.

La radioactivité cellulaire maximale observée est celle des cellules ayant été incubées pendant 3h avec 555 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG (Cf. Figure 23a). Cette valeur est significativement supérieure à celle des cellules incubées pendant 3h avec 115 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG ($p < 0,0001$) ou encore à celle des cellules incubées 2h avec 555 kBq/mL ($p = 0,02$). La rétention cellulaire de [¹⁸F]-FHBG pour 3h d'incubation avec 555 kBq/mL est 25 fois supérieure à celle des cellules témoins ($2,37 \pm 0,11\%$ pour les cellules exprimant la TK, et $0,09 \pm 0,01\%$ pour les cellules témoins, Cf. Figure 23b).

Ces résultats sont en accord avec une accumulation progressive de la [¹⁸F]-FHBG à l'intérieur des cellules, donc, un signal spécifique. En effet, plus le contact entre le traceur et les cellules est long, plus celles-ci le captent et le phosphorylent. En 2001, Alauddin *et al* ont également réalisé cette expérience avec 1h et 5h d'incubation. Entre ces deux temps, les taux de captation de [¹⁸F]-FHBG avaient été multipliés par 5, comme c'est le cas ici en 3h d'incubation. Après une heure à 37°C, la captation de la [¹⁸F]-FHBG par les cellules exprimant la TK était 31 fois supérieure à celle des cellules témoins. Ceci peut paraître bien supérieur à nos résultats, mais leur expérience ayant été réalisée sur une population de 5 million de cellules, il est normal que le signal soit augmenté (Alauddin *et al.*, 2001). De plus, les cellules avaient été transfectées avec un vecteur rétroviral et non un plasmide. Si nous avions réalisé cette expérience avec un nombre de cellules équivalent, par extrapolation, nous aurions

probablement eu une captation du traceur par les cellules exprimant la TK 25 à 30 fois supérieure à celle des cellules contrôles. Nous n'avons pas souhaité incuber nos cellules avec le traceur au-delà de 3h dans notre expérience, car, une incubation plus longue aurait nécessité de plus fortes doses de [¹⁸F]-FHBG, ce qui pourrait augmenter le bruit de fond ainsi que l'irradiation de l'animal dans le cas d'une expérience *in vivo*.

Nous avons également comparé les deux doses de [¹⁸F]-FHBG utilisées dans cette étude en calculant le rapport signal/bruit (Cf. Figure 24).

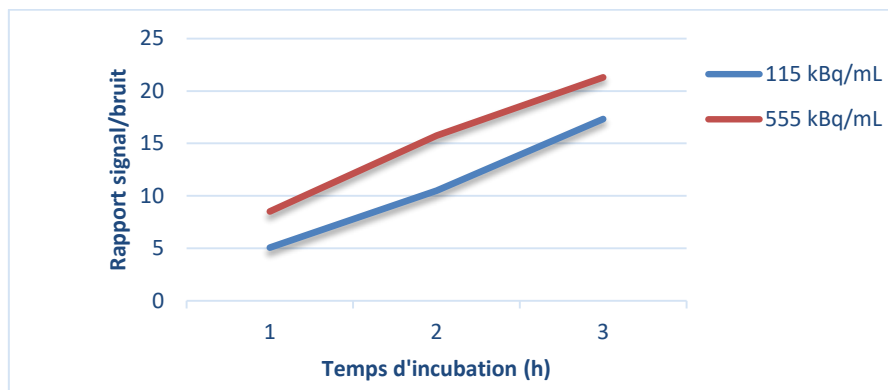


Figure 24 : Rapports signal/bruit observés avec 115 et 555 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG

On observe ainsi une nette augmentation du signal avec la dose de [¹⁸F]-FHBG, tout en gardant un pourcentage de captation comparable (Cf. Figure 23). Nous avons donc choisi un temps d'incubation de 3h et une dose de 555 kBq/mL de [¹⁸F]-FHBG pour la suite des expérimentations.

III.3.2.2 Etude B

Dans cette expérience, nous avons voulu évaluer la proportionnalité du signal avec le nombre de cellules exprimant la TK et donc la sensibilité de la méthode, c'est-à-dire, déterminer quelle est la plus petite quantité de cellules détectable avec le compteur, et avec la caméra TEP/CT. Nous avons donc évalué les activités de différentes quantités de cellules marquées avec de la [¹⁸F]-FHBG par ces 2 techniques.

Comme il a été décrit précédemment, les différentes quantités de cellules transfectées (TK) ou non (Ctl) ont été diluées dans du milieu de culture puis comptées grâce à un compteur γ ou déposées sur des plaques de 96 puits et imagées grâce à une caméra TEP/CT (Cf. Figure 25).



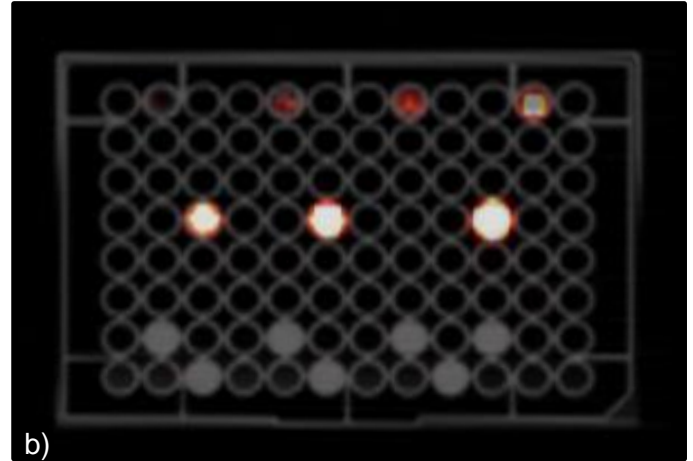
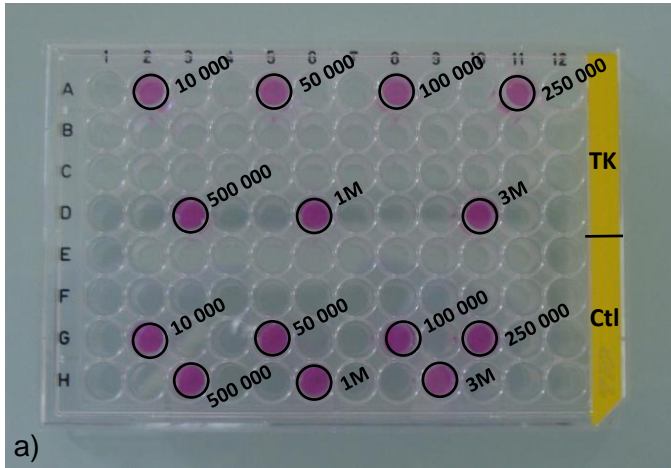


Figure 25 : Plaque de 96 puits contenant différentes quantités de cellules exprimant la TK et témoins (a) et son image obtenue grâce à la caméra TEP/CT

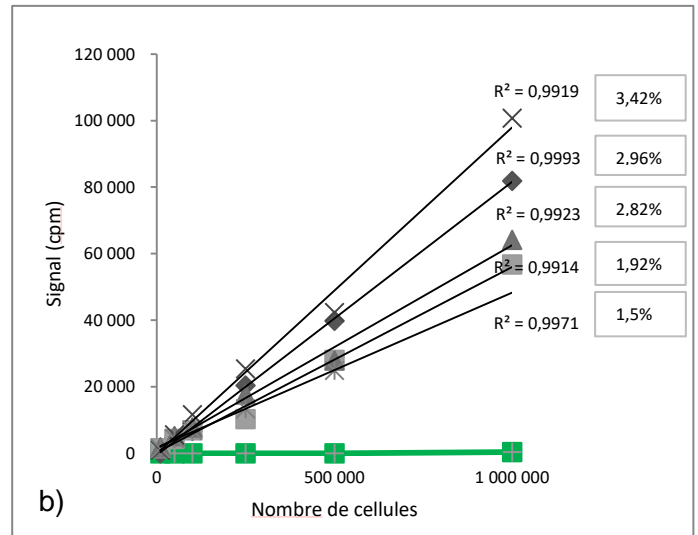
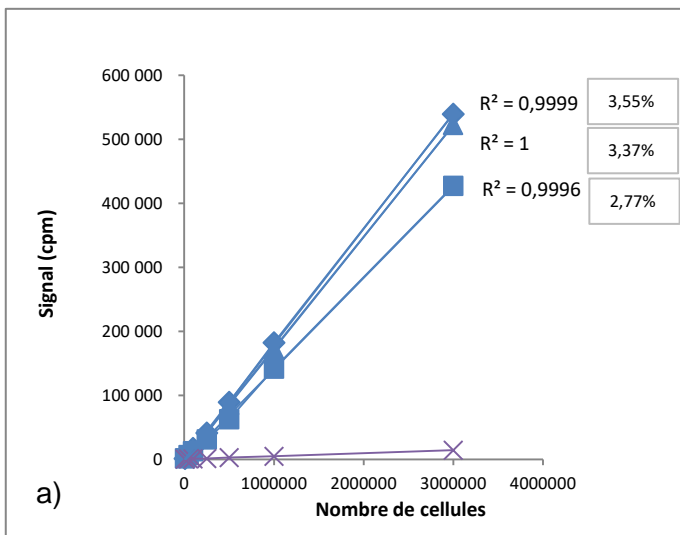


Figure 26 : Signal observé pour chaque quantité de cellules avec le compteur γ ($n = 3$), cellules exprimant la TK en bleu et cellules contrôles en rouge (a). Signal observé pour chaque quantité de cellules avec la caméra TEP/CT ($n = 5$), cellules exprimant la TK en

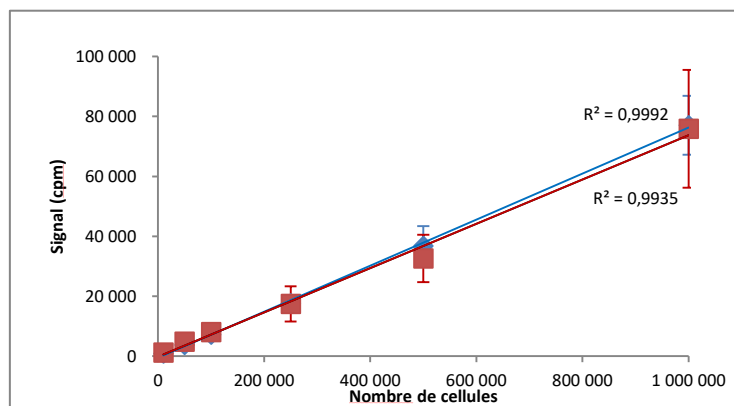


Figure 27 : Comparaison des signaux moyens observés avec le compteur γ (en bleu) et la caméra TEP/CT (en rouge)

Sur la Figure 26a, on constate tout d'abord une proportionnalité entre la quantité de cellules et le pourcentage de captation (r^2 moyen = 0,999, $n = 3$) même pour les faibles quantités de cellules (10 000 et 50 000), et une grande reproductibilité (signal obtenu pour des échantillons indépendants). Avec 1 million de cellules, la captation de la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG par les cellules exprimant la TK est, en moyenne, 33 fois supérieure à celle des cellules contrôles, ce qui est cohérent avec l'étude précédente. On peut donc déterminer le nombre de cellules exprimant la TK présentes dans notre échantillon en fonction signal.

Sur la Figure 26b, on observe également une proportionnalité entre le signal observé et la quantité de cellules (r^2 moyen = 0,994, $n = 5$). Concernant l'analyse d'images, le signal n'est pas homogène dans chaque puits, ce qui peut s'expliquer par une éventuelle précipitation ou agglutination des cellules durant l'acquisition, et à l'effet de volume partiel (un objet plus petit que deux fois la résolution spatiale du système d'acquisition des données a une activité sous-estimée par rapport à la réalité).

Une variabilité entre les pourcentages de captation des différents échantillons a été observée également avec le compteur, et semble liée à la variabilité de la captation du traceur par les cellules en fonction des échantillons ($2,52\% \pm 0,79\%$). La comparaison entre les comptages obtenus avec la caméra TEP/CT et le compteur (Cf. Figure 27), ne montre pas de différence significative entre les 2 mesures (test de Student, p -value = 0,626).

Avec la caméra TEP, le signal non spécifique moyen observé était de $921 \text{ cpm} \pm 807$ ce qui correspond, si on se réfère aux courbes de calibration obtenues avec les différentes quantités de cellules, au signal observé pour $15\,526 \pm 10\,910$ cellules. Ainsi, nous avons estimé le seuil de sensibilité de cette méthode (en faisant la somme du bruit de fond et de 2 écarts-type) situé entre 25 000 et 30 000 cellules.

Le bruit de fond dans le compteur γ étant faible, les résultats des tests de Student réalisés pour chaque concentration sont tous inférieurs à 0,05, la différence de captation entre les cellules transfectées et témoins, est donc significative dès 10 000 cellules.

Ainsi nous avons pu évaluer la sensibilité *in vitro* de nos 2 techniques de comptage :

- 30 000 cellules avec la caméra TEP ;
- et 10 000 avec le compteur γ .

Il est à noter cependant que cette sensibilité ne vaut que lorsque les cellules transfectées se trouvent en suspension dans du milieu de culture seul. En effet, sur la Figure 28 représentant pour chaque quantité de cellules le signal observé avec les cellules transfectées et témoins, le signal émis par les 3 millions de cellules contrôles, est supérieur à celui émis par 10000 cellules exprimant la TK. Ceci est dû au fait que la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG pénètre facilement dans les

cellules, expriment la TK ou non. Elle peut donc entrer dans les cellules témoins, mais ne s'y accumulera pas, contrairement aux cellules exprimant la TK. Ainsi, une faible quantité de [¹⁸F]-FHBG présente dans les cellules contrôles est responsable du signal détecté. Plus il y a de cellules contrôles, plus ce signal est important, ce qui génère un bruit de fond non négligeable. Dans le cas présent, avec la caméra TEP, on ne peut mettre en évidence la présence de cellules transfectées parmi des cellules non transfectées qu'à partir de 50 000 cellules. Ceci est un élément dont il faudra tenir compte *in vivo*, car les cellules greffées se trouveront alors dans un milieu contenant des milliers de cellules n'exprimant pas la TK responsables d'un signal aspécifique.

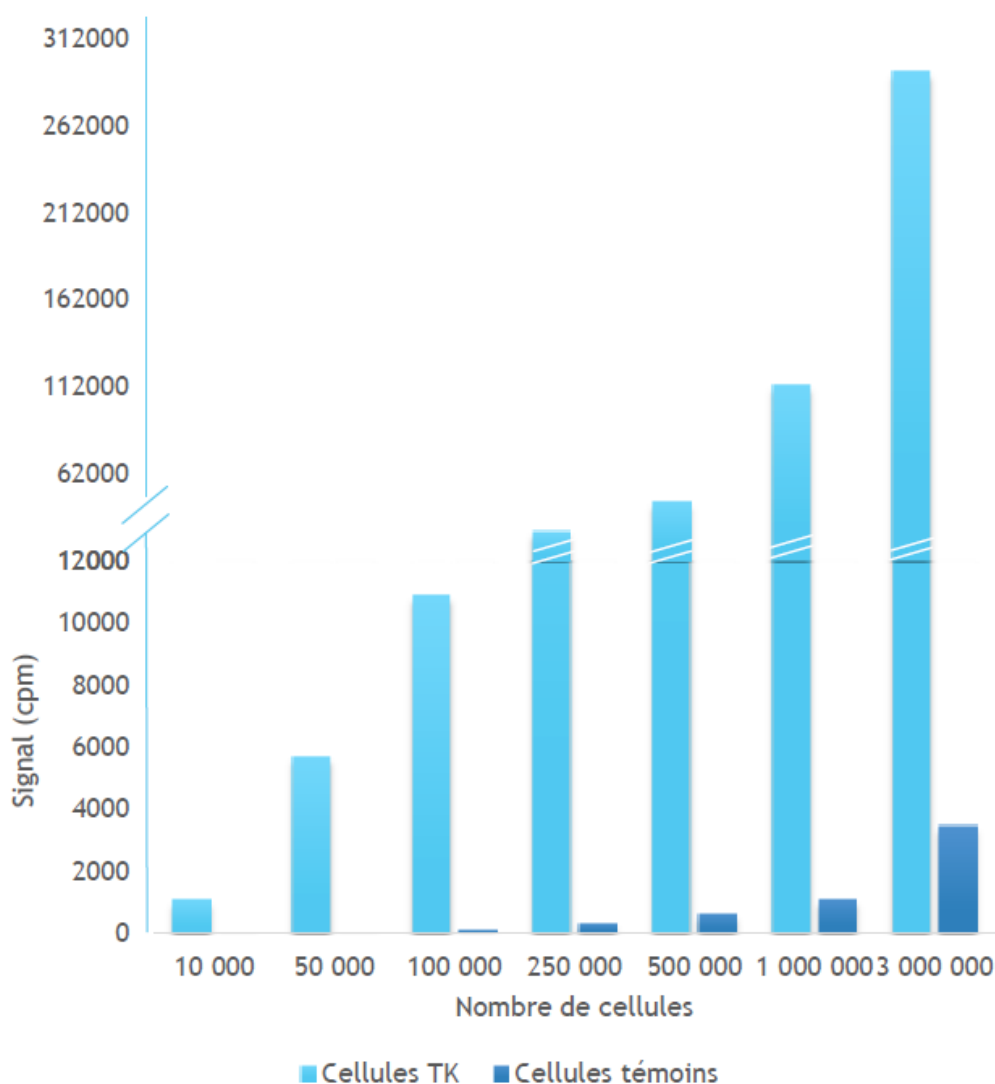


Figure 28 : Comparaison des signaux observés avec les cellules exprimant la TK et les cellules témoins grâce à la caméra TEP

Ainsi, ces premiers résultats d'étude de captation *in vitro* nous ont permis de définir le temps d'incubation optimal permettant une accumulation importante de [¹⁸F]-FHBG dans les cellules

sans impact sur la viabilité des cellules. Nous avons également pu choisir la concentration de [^{18}F]-FHBG à utiliser permettant le meilleur rapport signal sur bruit. Enfin nous avons déterminé la plus faible quantité de cellules détectables par deux méthodes de comptage : le compteur γ et la caméra TEP/CT. Par ailleurs, la gamme de calibration réalisée avec la caméra TEP/CT pourra être comparée avec les données acquises *in vivo*. Nous avons observé des différences de pourcentages de captation de la [^{18}F]-FHBG entre les différentes expérimentations réalisées mettant en évidence une certaine variabilité de la captation. Cette constatation présage des différences de captation de la [^{18}F]-FHBG *in vivo*.



IV. Utilisation du couple HSV1-tk/[¹⁸F]-FHBG dans le contrôle de la qualité de greffe cellulaire intracérébrale chez le rat

La deuxième étape de validation de l'utilisation de cet outil a été l'étude de quantification des cellules greffées chez l'animal. Le modèle animal qui a été choisi est le rat femelle Sprague-Dawley. Ce modèle de rat présente l'avantage d'avoir un cerveau d'un volume de 2 cm³, bien supérieur à celui de la souris (0,5 cm³). De plus, le protocole lésionnel a été entièrement décrit (Vaysse et al., 2015).

Dans cette expérience, nous avons greffé des cellules Neuro2a transfectées avec le gène de l'HSV1-tk (Neuro2a-TK) chez des rats présentant une lésion cérébrale responsable d'un déficit moteur. Dans un premier temps, nous avons testé la faisabilité de la technique HSV1-tk/[¹⁸F]-FHBG dans le cadre du contrôle de la procédure de greffe. La BHE étant peu perméable à la [¹⁸F]-FHBG, les cellules ont été pré-incubées avec le traceur avant la greffe (Etude n°1). Dans un deuxième temps nous avons testé ce même outil dans le suivi du greffon. Les cellules transfectées ont, cette fois-ci, été greffées sans avoir été pré-marquées avec la [¹⁸F]-FHBG. Le traceur a ensuite été injecté par voie intracérébrale (Etude n°2).

IV.1. Matériels et méthodes

IV.1.1. Induction des lésions corticales chez le rat

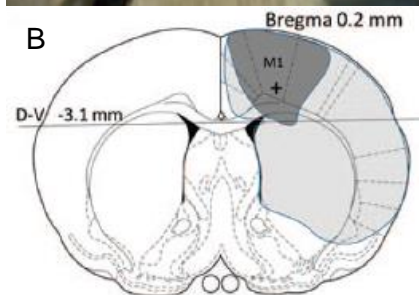


Figure 29 : Image de la tête d'un rat maintenue grâce au cadre stéréotaxique avant injection de malonate (A), et représentation schématique de la localisation de la lésion corticale (B)

Les 22 animaux utilisés ont été entretenus et traités selon les directives du Conseil des Communautés Européennes (Directive du 24 Novembre 1986, 86/609/EEC). Ce protocole a été approuvé par la Direction départementale de la Protection des Populations de la Haute-Garonne (autorisation n°31125507) et le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Midi-Pyrénées.

Les rats utilisés étaient des adultes Sprague-Dawley (300-350g, Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Ils ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (36mg) et médétomidine (0,47mg) par injection intra-péritonéale. Ils ont également reçu une prémédication à base de méthylprednisolone (0,4mg/kg) en prévention de l'œdème cérébral.

Les lésions corticales ont été réalisées au niveau de la région motrice des pattes antérieures, par une injection de malonate (5μL, 3M solution, pH 7,4 dans du PBS ; Sigma-

Aldrich, France) comme il a été décrit par Vaysse *et al.* (Vaysse et al., 2015). Le malonate est un inhibiteur de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale, et provoque ainsi une déplétion en ATP à l'origine d'une excitotoxicité secondaire (Fernandez-Gomez et al., 2005). Les rats ont été positionnés sur un cadre stéréotaxique (Cf. Figure 29, (Vaysse et al., 2015)) après avoir été rasés au niveau de la tête. Une anesthésie locorégionale avec de la lidocaïne a été réalisée sur la peau du scalp et sur l'os. Après avoir repéré la zone du bregma (soudure des os du crâne), l'os a été perforé 2 mm à gauche de ce repère anatomique à l'aide d'une fraise circulaire à tête diamant. Une microseringue Hamilton a été insérée au niveau de leur hémisphère gauche en suivant les coordonnées stéréotaxiques suivantes : 2,5 mm à côté du Bregma, et 2 mm de profondeur (Paxinos and Watson, 1998). Le malonate a ensuite été injecté à un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ à l'aide d'un injecteur automatique. Après l'injection des 5 μL , la microseringue a été laissée en place pendant 5 min pour permettre une diffusion complète de la solution injectée. L'incision a ensuite été refermée, et les rats ont été replacés dans leur cage. Afin de minimiser le temps d'anesthésie, ils ont été réveillés grâce à une injection d'Antisedan®. Les rats ont été étudiés pendant les 3 premiers jours après l'injection et ont montré un déficit au niveau de la patte avant droite.

La Figure 30 représente des coupes de cerveaux de rats lésés dans un premier temps, puis greffés avec des cellules souches nerveuses multipotentes humaines (NSCs), et enfin leur analyse par immunohistochimie.

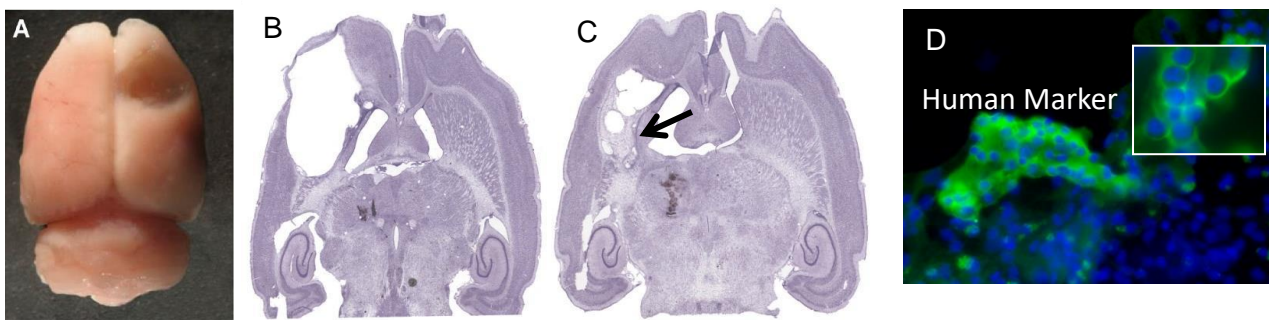


Figure 30 : Cerveau de rat lésé (A), coupes de cerveaux de rats lésés avant (B) et après greffe (C) et analyse par immunohistochimie (D) – Unité ToNIC, UMR1214 Equipe 2

IV.1.2. Etude n°1 : Greffe intracérébrale de cellules exprimant l'HSV1-tk pré-incubées avec la [^{18}F]-FHBG

Le but de cette étude était de vérifier la qualité du protocole de greffe et que le signal obtenu avec la caméra TEP/CT *in vivo* était relié à la quantité de cellules greffées de la même manière que dans les expériences *in vitro*. Pour cela, 15 jours après la lésion corticale des cerveaux des rats, c'est-à-dire à la fin de la phase inflammatoire ayant suivi la lésion, une deuxième

intervention a été réalisée afin d'implanter différentes quantités de cellules Neuro2a exprimant la TK, pré-marquées avec la [¹⁸F]-FHBG.

L'incubation avec la [¹⁸F]-FHBG et la préparation des cellules ont été réalisés comme il a été décrit lors des expériences *in vitro* (étude B) juste avant la transplantation afin d'avoir le plus possible de cellules viables, et un signal optimal.

Les rats anesthésiés ont ensuite été placés sur un cadre stéréotaxique et 5µL de suspension de cellules marquées (Neuro2a-TK) ont été injectées lentement (1 µL/min) au niveau de la région lésée de chaque animal, à l'aide d'une microseringue Hamilton équipée d'une aiguille de 22G. Six quantités différentes de cellules ont été transplantées : 10 000 (n=1), 50 000 (n=2), 100 000 (n=3), 250 000 (n=1), 500 000 (n=3), et 1 000 000 (n=4). Au total, 14 animaux ont permis la réalisation de la gamme étalon *in vivo*. Après l'injection, nous avons laissé l'aiguille en place pendant 5 min afin de permettre aux cellules de diffuser à l'intérieur de la lésion. Afin de vérifier si le volume injecté avait une influence sur la qualité de la greffe, nous avons également essayé d'injecter des volumes plus importants (8 et 10 µL).

En parallèle, nous avons réalisé une gamme de calibration *in vitro* avec la suspension de cellules utilisées pour la greffe : 10 000, 50 000, 100 000, 250 000, 500 000 et 1 000 000 de cellules ont été disposées, dans une plaque de 96 puits et imagées grâce à la caméra TEP/CT.

Les rats greffés ont ensuite été imagés à leur tour après la greffe grâce à une caméra TEP/CT (Biograph siemens).

IV.1.2.1 Imagerie TEP des animaux

Les rats ont été imagés 15 à 30 min après l'implantation des cellules. L'acquisition des images des rats s'est déroulée selon les mêmes modalités que pour les cellules seules (topogramme scanner, puis acquisition TEP de 15 min 2 fois). Toutes les images sont automatiquement corrigées de la décroissance radioactive. Les images tomographiques ont été fusionnées aux images TEP après reconstruction. Les images tomographiques ont également été utilisées pour corriger l'atténuation des images TEP.

IV.1.2.2 Analyse des images et étude de quantification

Le traitement des images reconstruites a été réalisé grâce au logiciel Sisyphe. Les VOI ont été définies à partir des images TEP des rats greffés. Il a d'abord été vérifié que les VOI étaient situées au niveau de la lésion et qu'il n'y avait pas de signal ailleurs que dans cette zone. Les lésions n'étant pas homogènes, la répartition des cellules au sein de la lésion a pu être variable, le volume de ces VOI n'était donc pas le même selon les animaux. Nous n'avons pas effectué de seuillage, la VOI a été prise de telle sorte qu'elle soit la plus large possible. Nous

avons choisi d'utiliser la même technique que pour la gamme faite *in vitro* avec les plaques de 96 puits. Le signal des VOI a été calculé de la même façon que pour les cellules seules :

$$\text{Signal du VOI} = \text{activité moyenne du VOI} \times \text{volume du VOI} \times \text{facteur de correction}$$

Ce signal a été converti en cpm pour chaque quantité de cellules Neuro2a-TK utilisées dans l'expérience.

Pour pouvoir comparer toutes les expériences, des corrections de décroissance ont été appliquées pour ramener toutes les activités à 5h après le début de l'incubation des cellules avec la [¹⁸F]-FHBG.

IV.1.2.3 Analyses statistiques et détermination du seuil de sensibilité

Les données ont été exprimées par la moyenne \pm l'erreur standard. Les analyses statistiques des 2 groupes de rat indépendants ont été réalisées grâce à un test de Student (bilatéral, $\alpha = 0,05$) sur le logiciel Xcel stat. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la p value était inférieure à 0,05.

Toute valeur de signal inférieure à deux fois l'écart type du bruit de fond n'a pas été considérée comme un signal spécifique. Pour déterminer la sensibilité de cette technique (sa limite de détection), le bruit de fond a été évalué, et la valeur, correspondant à la somme du bruit de fond et de deux écarts-types, a été reportée sur la courbe de calibration.

IV.1.3. Etude n°2 : Marquage *in vivo* par injection intracérébrale de [¹⁸F]-FHBG après greffe des cellules

Dans cette deuxième expérience, nous avons souhaité évaluer la possibilité de marquer les cellules exprimant la TK *in vivo*. Pour cela, 1 ou 3 millions de cellules n'ayant pas été pré-incubées avec la [¹⁸F]-FHBG, ont été injectés par stéréotaxie à des rats présentant une lésion corticale comme décrit précédemment. Un jour plus tard, 1110 kBq de [¹⁸F]-FHBG dans un volume maximal de 5 μ L ont été injectés, directement par voie intracérébrale, à un débit de 1 μ L/min en utilisant le même protocole que la greffe des cellules. Cette activité correspond à une incubation de 555 kBq/mL *in vivo*, le volume d'un cerveau de rat étant considéré comme étant de 2 mL approximativement (Sullivan et al., 2006). Un rat témoin n'ayant bénéficié d'aucune greffe de cellules a également reçu de la [¹⁸F]-FHBG. Les animaux ont ensuite été imagés 90 et 160 min après l'injection de [¹⁸F]-FHBG en utilisant les mêmes paramètres que ceux décrits plus haut. Le rapport signal cerveau / signal cœur a ensuite été calculé pour chaque rat. Les VOI des régions greffées, ont été quantifiées comme précédemment et corrigées de la décroissance radioactive, ainsi que du bruit de fond en utilisant le signal obtenu du cerveau du rat témoin.

IV.1.4. Etude n°3 : Etude de la stabilité de la capture de la [¹⁸F]-FHBG *in vivo*

Enfin, dans une dernière expérience, nous avons souhaité vérifier que la [¹⁸F]-FHBG captée par les cellules Neuro2a-TK n'était pas relarguée après greffe. Nous avons donc comparé les images obtenues avec 3 rats ayant reçu des cellules Neuro2a-TK pré-marquées, avec celles du rat témoin non greffé, chez lequel nous avons injecté 1110 kBq de [¹⁸F]-FHBG par voie intracérébrale.

IV.2. Résultats

IV.2.1. Etude n°1 : Suivi *in vivo* des cellules greffées marquées avec la [¹⁸F]-FHBG et quantification après greffe

Cette première expérience avait deux objectifs :

- le contrôle qualité du protocole de greffe ;
- vérifier la proportionnalité du signal obtenu avec le nombre de cellules greffées.

IV.2.1.1 Contrôle de la qualité du protocole de greffe

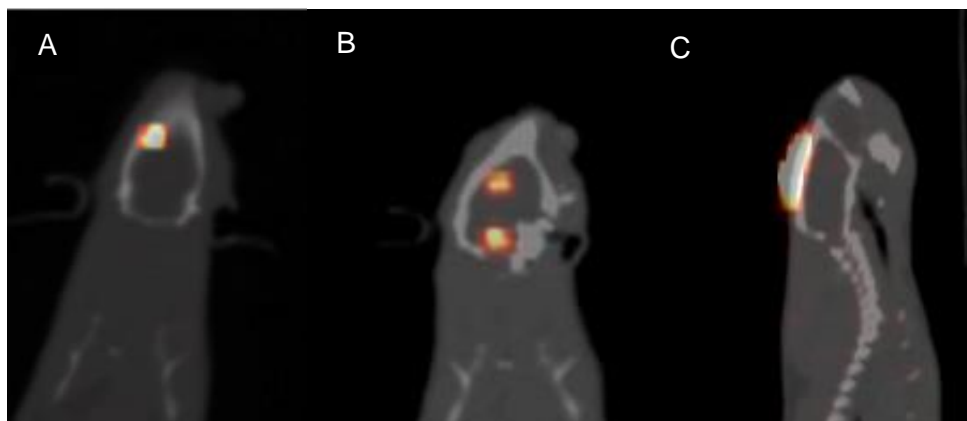


Figure 31 : Images TEP de rats greffés dans le cas d'une injection faite dans de bonnes conditions (A), d'une injection d'un volume trop important de suspension cellulaire (B), ou lors d'un mauvais positionnement de l'aiguille (C)

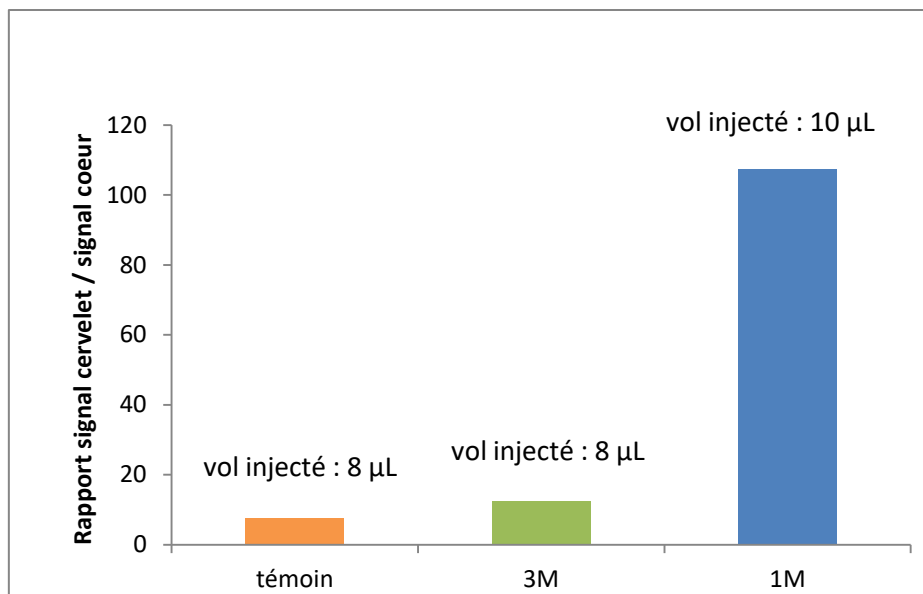


Figure 32 : Comparaison du signal observé dans le cervelet par rapport au coeur (ratio cpm cervelet / cpm coeur) lors d'une injection de 1 million de cellules témoins dans un volume de 8µL (orange), 3 million de cellules transfectées dans 8µL (vert), et 1 million de cellules transfectées dans 10µL (bleu).

La Figure 31 montre les images TEP/CT de rats greffés. Quand la greffe est faite dans de bonnes conditions (volume de la suspension cellulaire injecté inférieur à 5µL, bas débit d'injection), le signal observé par imagerie TEP/CT est nettement visible au site d'injection (Cf. Figure 31A). Dans les différentes expériences réalisées, nous avons testé d'autres volumes d'injection (Cf. Figure 32). Nous avons pu observer à partir de 10 µL un reflux de la suspension dans le liquide céphalorachidien au niveau des citernes cérébrales et du cervelet (Cf. Figure 31B et 32). La superposition des images obtenues par TEP et de celles obtenues par tomographie permet aussi de vérifier que le greffon se situe bien dans la zone lésée. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 31C, un mauvais positionnement de l'aiguille, un mouvement du rat après l'injection des cellules, ou encore, une pression trop importante, peuvent être à l'origine d'un reflux des cellules de la région lésée vers le scalp. Ceci souligne l'importance du contrôle des paramètres d'injection pour assurer la qualité de la greffe.

IV.2.1.2 Quantification du nombre de cellules Neuro2a-TK marquées après greffe chez le rat

La figure suivante montre les images TEP/CT des rats greffés avec différentes quantités de cellules.



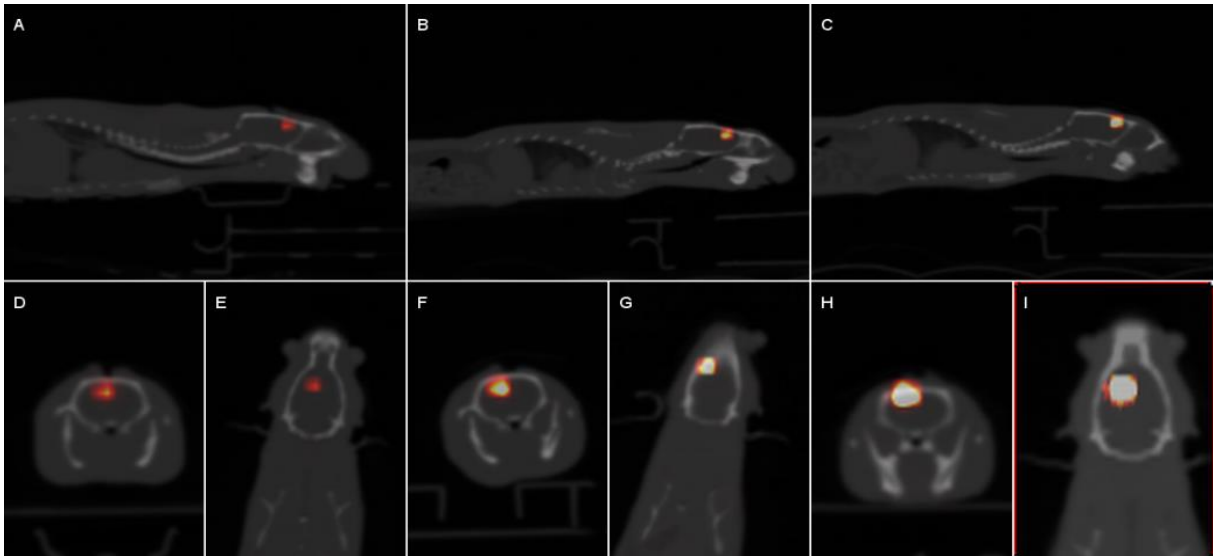


Figure 33 : Images PET/CT des rats greffés avec les cellules Neuro2a exprimant la TK pré-incubées avec la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG selon différentes axes. Les quantités de cellules greffées étaient de : 1×10^5 (ADE), 5×10^5 (BFG); et 1×10^6 cellules (CHI).

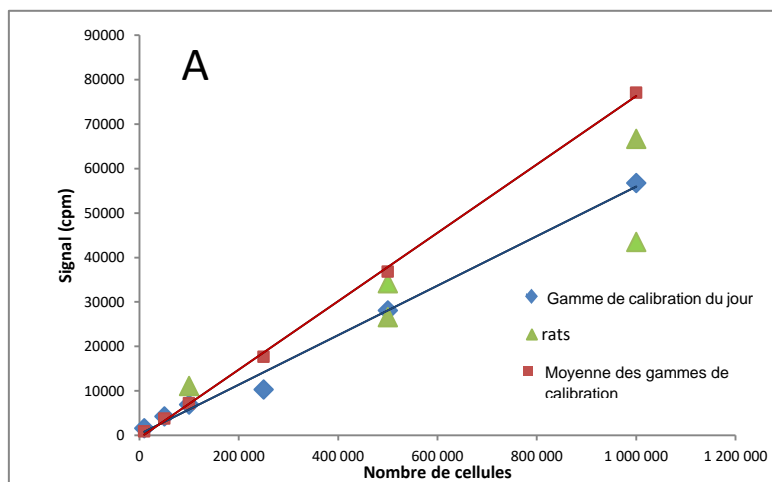


Figure 34 : Signal observé chez les rats corrigé de la décroissance (triangles verts) en fonction de la quantité de cellules Neuro2a-TK marquées avec de la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG qu'ils ont reçu ($n = 5$).

Pour quantifier le nombre de cellules Neuro2a-TK marquées ayant été greffées, nous avons comparé le signal obtenu en imagerie TEP à 2 gammes étalons :

- une gamme étalon réalisée le jour même avec la même suspension cellulaire que celle utilisée pour la greffe,
- la moyenne de toutes les gammes étalon TEP réalisées lors des expérimentations *in vitro* ($n = 5$).

En effet, il avait été constaté lors des expériences réalisées *in vitro* une variabilité de captation cellulaire de la $[^{18}\text{F}]$ -FHBG entre les différentes suspensions ayant servi à faire les gammes.

Nous avons donc réalisé une gamme étalon du jour afin de déterminer quelle était la méthode la plus fiable pour quantifier nos cellules.

Les analyses quantitatives des différentes images TEP/CT obtenues à partir des rats greffés ont montré une meilleure corrélation entre la quantité réelle de cellules injectées et la quantité calculée à partir des images, en utilisant la gamme de calibration du jour ($p = 0,71$) qu'avec la moyenne des gammes réalisées précédemment ($p = 0,56$). Il est ainsi plus judicieux d'utiliser la gamme de calibration réalisée le jour même.

Il est à noter que le signal obtenu à partir des rats, correspond bien à la gamme réalisée *in vitro*, ce qui montre que la correction d'atténuation faite grâce au scanner est efficace. Nous pouvons donc quantifier nos cellules même au sein d'un tissu profond.

IV.2.2. Etude n°2 : Marquage *in vivo* pour la quantification des cellules greffées

Pour évaluer la possibilité de marquer les cellules exprimant la TK *in vivo*, des cellules Neuro 2a-TK n'ayant pas été pré-incubées avec la [¹⁸F]-FHBG ont été greffées chez le rat, puis nous avons injecté le traceur dans un deuxième temps par voie intracérébrale pour lui permettre d'accéder aux cellules. L'objectif de cette étude était de tester notre outil en injectant directement la [¹⁸F]-FHBG chez l'animal.

3.10^6 ou 1.10^6 cellules Neuro2a-TK ont été greffées chez des rats. Le lendemain de la greffe, 1110 kBq de [¹⁸F]-FHBG ont été injectés par voie intracérébrale chez les rats greffés ou chez un rat témoin (lésé mais non greffé). Les rats ont ensuite été imagés grâce à une caméra TEP/CT.

La Figure 35 représente les images TEP obtenues avec les rats greffés et témoins.



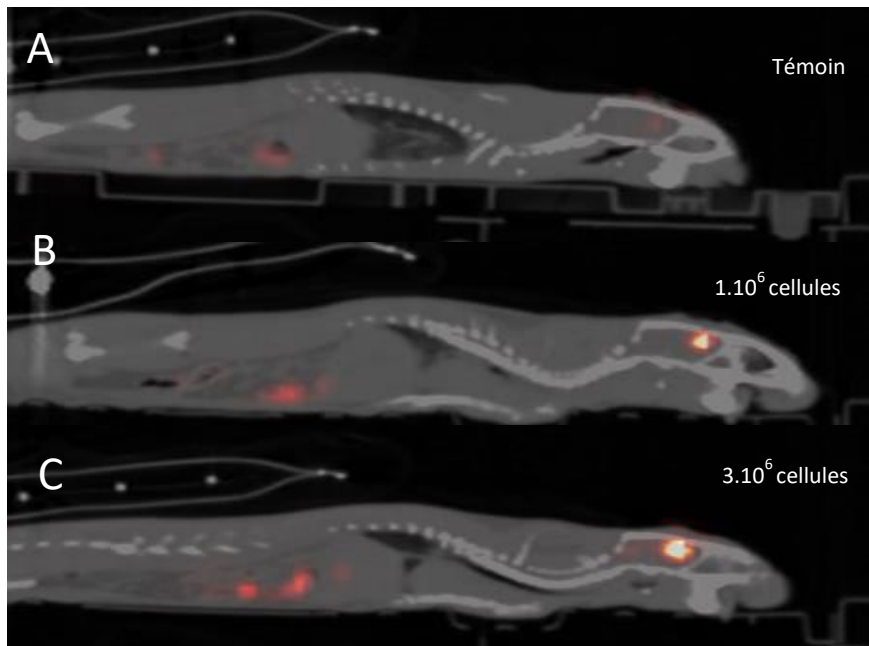


Figure 35 : Marquage in vivo par injection de $[^{18}\text{F}]$ -FHBG après greffe des cellules exprimant la TK

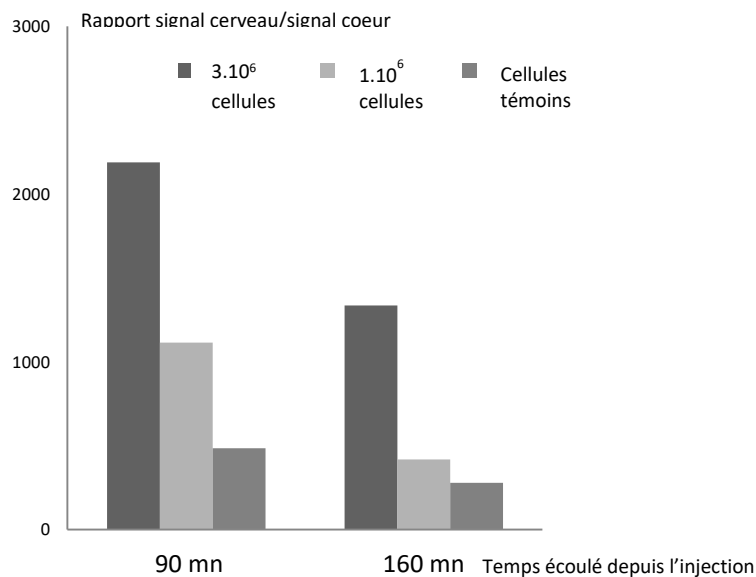


Figure 36 : Rapport du signal observé au niveau du cerveau par rapport à celui du cœur en fonction du temps écoulé depuis l'injection du traceur

Les données de TEP à 90 et 160 mn après l'injection, ont montré une distribution du radiotracer dans le corps entier et un signal plus important dans le cerveau des rats greffés (Cf. Figure 35). La rétention de $[^{18}\text{F}]$ -FHBG a été observée au niveau du greffon jusqu'à 160 minutes après l'injection. Le rapport entre le signal observé au niveau du cerveau et du cœur (fixation non spécifique) à 90 et 160 mn après injection est bien corrélé au nombre de cellules greffées (Cf. Figure 36). En effet, après correction de la désintégration et soustraction de

l'activité observée dans le cerveau des rats témoins, le nombre de cpm obtenu est bien inclus dans l'intervalle de confiance donné par la gamme de calibration moyenne : par exemple, pour 3 millions de cellules le signal était de 255 000 cpm alors que l'intervalle de confiance donné par la gamme de calibration était de 110 000 à 256 000 cpm.

Les résultats de cette expérience sont donc en accord avec ceux observés chez les rats greffés avec des cellules exprimant la TK pré-marquées par la [^{18}F]-FHBG. Cependant, les conditions d'incubation du traceur avec les cellules *in vivo* et *in vitro* étant différentes, il est difficile de dénombrer précisément le nombre de cellules injectées. Cette étude pilote n'ayant été réalisée que sur 3 animaux, elle est à confirmer sur d'autres rats afin d'avoir une puissance statistique plus importante.

IV.2.2.1 Etude n°3 : Stabilité de la capture cellulaire *in vivo*

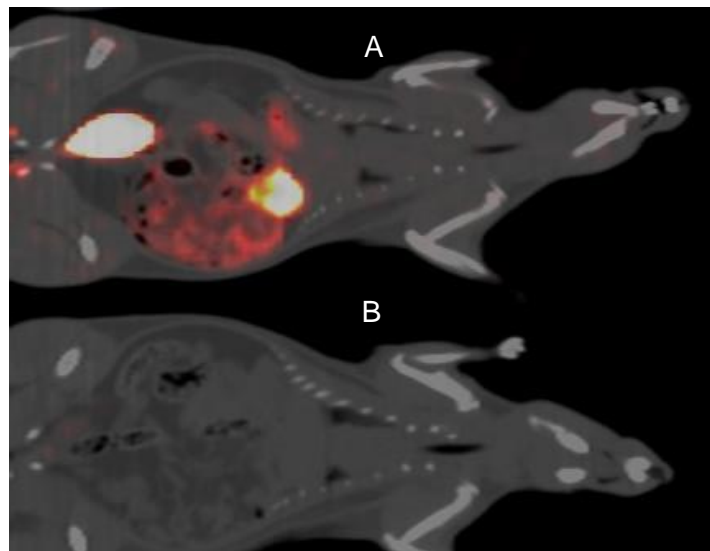


Figure 37 : Images TEP/CT du rat témoin non greffé ayant reçu une injection de [^{18}F]-FHBG intracérébrale (A), et d'un rat ayant été greffé avec des cellules Neuro2a-TK pré-marquées avec la [^{18}F]-FHBG (B)

Dans cette expérience, nous avons également souhaité mettre en évidence un éventuel relargage de la [^{18}F]-FHBG captée par les cellules. Pour cela, la distribution de [^{18}F]-FHBG seule après injection intracérébrale chez un rat lésé mais non greffé a été étudiée pendant 2 h. Dès 15 min après l'injection, il a été constaté une absorption de [^{18}F]-FHBG dans plusieurs organes : la rate, le tractus intestinal, le rein et la vessie (Cf. Figure 37A), ce qui correspond à la distribution normale du radiotracer (Yaghoubi et al., 2001). Cette distribution a ensuite été comparée à la cinétique du traceur obtenue avec les rats greffés avec les cellules Neuro2A-TK pré-marquées par [^{18}F]-FHBG (Cf. Figure 37B). Aucune absorption de [^{18}F]-FHBG n'a été observée dans aucun organe, même 2h après l'injection (n = 3). Le signal n'a été localisé que

dans la zone greffée, ce qui confirme qu'il n'y a pas de relargage de [¹⁸F]-FHBG ou de ¹⁸F seul lors de la greffe et 2h après à cause d'une lyse cellulaire ou un autre phénomène.

IV.3. Discussion

La thérapie cellulaire émerge comme une innovation thérapeutique majeure en médecine. Il est donc primordial de pouvoir suivre ces cellules et de comprendre les mécanismes menant au succès ou à l'échec de cette thérapie. Dans cette étude, nous avons étudié la faisabilité du suivi de cellules greffées intracérébrales grâce à un système comprenant un gène rapporteur, l'HSV1-tk, et sa sonde, la [¹⁸F]-FHBG.

Nous avons tout d'abord mis au point la synthèse de cette sonde radiomarquée dans notre centre, et l'optimisation de cette synthèse nous a permis d'obtenir un rendement comparable à ce qui a été rapporté dans la littérature. La solution obtenue ne contient pas d'acétonitrile, contient moins de 10% d'éthanol, et peut être diluée dans du chlorure de sodium. Nous pourrions ainsi envisager d'utiliser cette molécule dans le cadre d'un médicament expérimental, le dossier de lot concernant les solvants serait valide.

Par ailleurs, nous avons obtenu après transfection et sélection par la néomycine une population de clones exprimant l'HSV1-tk de manière stable. Les promoteurs viraux les plus utilisés, dérivant le plus souvent de virus comme le CMV, permettent certes un haut niveau d'expression du gène, mais ils peuvent être rapidement inactivés par méthylation des îlots CpG. L'utilisation d'un promoteur de mammifères sans îlots CpG, nous a permis d'obtenir des clones exprimant le transgène à un niveau plus faible, mais plus durable dans le temps (Gill et al., 2001 ; Varma et al., 2011). Cette population est hétérogène, c'est à dire que le transgène s'étant intégré de manière aléatoire dans le génome, les cellules ont un niveau d'expression de la TK variable.

Les études de captation de la [¹⁸F]-FHBG *in vitro* nous permettent d'affirmer que la [¹⁸F]-FHBG est captée sélectivement par les cellules exprimant l'HSV1-tk, et montrent une forte accumulation dans ces cellules, en comparaison à des cellules témoins. La comparaison de deux solutions de [¹⁸F]-FHBG de concentrations différentes incubées avec les cellules transfectées, montre une nette augmentation du signal entre ces deux doses. Cependant le pourcentage de captation de la [¹⁸F]-FHBG est comparable dans les deux cas, ce qui met en évidence que dans cet ordre de concentration en [¹⁸F]-FHBG, l'activité enzymatique de la TK n'est pas saturée. Aucun impact sur la viabilité des cellules n'a été observé, c'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre les expérimentations en utilisant la plus haute concentration afin d'augmenter la sensibilité de la technique et de mieux repérer les zones d'accumulation du traceur. La dose utilisée par d'autres équipes de recherche est en moyenne de 150 Bq/mL (Tjuvajev et al., 2002).

Le signal obtenu est proportionnel à la quantité de cellules exprimant la TK. Nous avons réalisé plusieurs gammes étalon à l'aide d'un compteur γ et d'une caméra TEP/CT, et nous avons déterminé la sensibilité de notre technique avec ces deux types d'appareil de comptage. La sensibilité *in vitro* a ainsi été évaluée à environ 30 000 cellules avec la caméra TEP/CT, et 10 000 cellules avec le compteur. Cette différence était attendue, elle est liée à la méthode de détection bien plus sensible avec le compteur que la caméra TEP.

Toutefois, le signal détecté avec les solutions de cellules témoins est non négligeable. Il s'agit d'un signal non spécifique dû à la capacité du traceur à entrer librement dans les cellules non transfectées sans s'y accumuler. Ce phénomène risque d'engendrer une dégradation du rapport signal sur bruit par une augmentation importante du bruit du fond, et donc, augmenter le seuil de sensibilité de la technique. Ceci n'est pas à prendre en compte avec le compteur γ , car il n'est pas utilisé comme méthode de comptage *in vivo*, mais il doit être considéré avec la caméra TEP/CT, lorsque les cellules ne sont pas pré-incubées avec le traceur, et que celui-ci est injecté par voie systémique *in vivo* (intraveineuse ou intracérébrale). En effet, lorsque les cellules exprimant la TK greffées sont mises en contact avec la [^{18}F]-FHBG *in vivo*, elles se trouvent dans un milieu contenant des milliers de cellules n'exprimant pas la TK responsables d'un signal aspécifique pouvant masquer le signal spécifique, si celui-ci est faible. C'est pourquoi lors des études de captation *in vivo*, il est intéressant d'imager un rat témoin non greffé afin de mesurer ce signal aspécifique et de le soustraire au signal obtenu avec les rats greffés. Il est également important de respecter un certain temps d'incubation afin que la [^{18}F]-FHBG ait le temps de s'accumuler dans les cellules transfectées. Un long temps d'incubation implique d'utiliser de plus fortes doses de [^{18}F]-FHBG, c'est pourquoi un compromis doit être fait entre la dose et le temps d'incubation. Cela améliore le rapport signal sur bruit. Nous avons choisi 3h d'incubation et une dose de 555 kBq/mL, car cette activité n'a pas montré d'impact sur la viabilité des cellules. En tenant compte de ce phénomène, la sensibilité de notre technique *in vitro* avec la caméra TEP passe de 30 000 à 50 000 cellules. En 2008, Waerzeggers *et al* ont comparé la captation du [^{124}I]-FIAU et de la [^{18}F]-FHBG par des cellules de gliomes exprimant l'HSV1-tk *in vitro* et *in vivo* après injection de ces cellules chez des rats (Waerzeggers *et al.*, 2008). La plus petite quantité de cellules détectée par micro-PET *in vitro* était de 5×10^3 dans 100 μL . De même, Su *et al* en 2004 ont obtenu, avec des cellules Neuro2A ayant intégré dans leur génome l'HSV1-sr39tk (un mutant phosphorylant de préférence les dérivés acycloguanosine), une limite de détection *in vitro* de 1×10^5 dans un volume de 200 μL (Su *et al.*, 2004). Ceci est cohérent avec notre limite de détection proche de 50 000 cellules, d'autant plus que dans les études précédemment citées, le niveau d'expression de la TK et les conditions expérimentales n'étaient pas les mêmes. Il est important de noter que cette limite de détection dépend, certes de la sensibilité de la caméra, mais surtout de l'absorption



biologique de la [^{18}F]-FHBG dans les tissus sains qui diminue avec le temps d'incubation. Pour améliorer cette limite de détection, il serait donc plus utile de miser sur un promoteur fort permettant un niveau d'expression de la TK plus important que sur des caméras TEP/CT de dernière génération.

Par ailleurs, nous avons constaté des différences de pourcentages de captation de la [^{18}F]-FHBG en fonction des gammes de dilution réalisées, qui mettent en évidence une certaine variabilité de la captation. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules ont été congelées entre leur transfection et la réalisation des expériences de captation, ce qui a sans doute eu un impact sur l'activité enzymatique de la TK. Une autre explication peut être que la population de cellules transfectées avec le gène HSV1-tk étant hétérogène, le niveau d'expression de la TK est variable selon les cellules. Ces cellules ayant été séparées et cultivées dans des boîtes de culture différentes, afin de réaliser les gammes de calibration, il suffit que le niveau d'expression de la TK des populations de départ soit différent entre les boîtes pour que la captation du traceur ne soit pas la même selon les populations.

La sensibilité de notre technique a ensuite été évaluée *in vivo* à 50 000 cellules environ. En utilisant des promoteurs différents et des doses différentes de radiotracer, d'autres équipes de recherche ont obtenu une sensibilité *in vivo* de 100 000 cellules en utilisant des cellules cancéreuses greffées en sous-cutané (Johnson et al., 2009; Su et al., 2004). Avec le protocole que nous avons utilisé, nous sommes capables de dénombrier un plus faible nombre de cellules que les équipes précédemment citées, d'autant plus que dans ces publications le gène rapporteur utilisé était l'HSV1-*sr39tk*, connu pour avoir un niveau d'expression plus important.

Les études de captation *in vivo* démontrent que le contrôle de la qualité de la greffe est possible par la réalisation d'images TEP/CT des rats greffés avec ces cellules visualisables grâce au système HSV1-tk/[^{18}F]-FHBG. En effet, l'imagerie TEP est suffisamment sensible pour détecter les cellules greffées viables et les quantifier, et bénéficie d'une résolution spatiale suffisante pour déterminer la localisation de ces cellules au sein du cerveau. Le couplage de la TEP avec le scanner, permet de corriger les données obtenues de l'atténuation des rayonnements par le crâne des animaux. Les résultats observés correspondent alors parfaitement aux données obtenues lors des expériences *in vitro*, ce qui montre que la quantification des cellules *in vivo* est possible, en utilisant une gamme de calibration réalisée avec les mêmes cellules. Il est à noter que la gamme de calibration utilisée devra être réalisée, le jour même, avec la même suspension cellulaire. Dans l'hypothèse d'un suivi longitudinal sur plusieurs semaines, cette gamme servira ensuite de référence, afin d'évaluer la capacité de captation des cellules.



La stabilité de la captation a également été vérifiée, en recherchant des traces de radioactivité dans les organes des rats après greffe des cellules marquées. Aucun relargage de [¹⁸F]-FHBG n'a été constaté, ce qui n'aurait pas été le cas si nous avions choisi le transporteur de l'iode hNIS comme gène rapporteur (Schipper et al., 2003). Ceci démontre également que notre procédure de greffe ne nuit pas à l'intégrité des cellules. Si le fait d'injecter les cellules en intracérébral dans une zone hostile provoquait immédiatement une lyse cellulaire, nous aurions observé un relargage du traceur par perte d'intégrité des membranes plasmiques.

Cependant, la faible perméabilité de la BHE à la [¹⁸F]-FHBG est un facteur limitant (Yaghoubi et al., 2001 ; Schaller et al., 2008; Yaghoubi et al., 2012). Certaines pathologies cérébrales comme l'AVC peuvent causer une rupture de cette barrière, mais la durée de cette rupture et son amplitude sont très variables en fonction de la localisation et de la taille de la lésion (Moisan et al., 2014; Strbian et al., 2008), ce qui rend très difficile le suivi longitudinal du greffon avec la [¹⁸F]-FHBG. Ceci a, par ailleurs, été confirmé par une autre équipe de recherche, qui a réussi à assurer un suivi de NSCs greffés chez des rats lésés pendant quelques mois, mais, uniquement aux endroits où le BHE était altérée (Daadi et al., 2009). Ici, les injections de [¹⁸F]-FHBG ont été réalisées directement par voie intracérébrale pour contourner ce problème. Pour adapter cette technique au suivi longitudinal du greffon chez l'animal, il serait intéressant de mettre en place un cathéter intracérébral. Cette voie étant très invasive, elle n'est pas applicable chez l'homme.

Permettre à un agent thérapeutique de franchir la BHE est un des défis majeurs de la recherche à l'heure actuelle. Plusieurs stratégies ont été testées. Elles incluent notamment la modification de petites molécules hydrosolubles en molécules liposolubles, l'utilisation de protéines transporteur, l'injection transcrânienne via des cathéters, ou encore les agonistes de la bradykinine (Dasgupta et al., 2016; Bartus et al., 1996). Ces dernières années, en plus des stratégies mentionnées ci-dessus, la combinaison des ultrasons et de microbulles a elle aussi montré une efficacité dans l'amélioration de l'administration de médicaments au cerveau. Ces microbulles sont des vésicules remplies de gaz mesurant 1 à 5 µm enveloppées de phospholipides, protéines ou polymères. Les ultrasons sont capables de diminuer la pression localement au niveau des vaisseaux cérébraux, faisant osciller ces microbulles entraînant la perturbation temporaire de la BHE par différents mécanismes physiques (Dasgupta et al., 2016). Cette perturbation de la BHE est temporaire, et permettrait le passage de certains médicaments au niveau du cerveau. Cette technique a déjà été appliquée dans plusieurs études précliniques chez le rongeur afin de traiter des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, Huntington ou certaines tumeurs cérébrales (Fan et al., 2013; Jordão et al., 2010; Burgess et al., 2012), mais aussi chez le macaque (McDannold et al., 2012). Aucune lésion tissulaire importante ou déficit fonctionnel n'ont été observés lors de ces études (Dasgupta et

al., 2016). Fin 2015, à Toronto, Hynynen *et al* ont lancé la première étude de sonoperméabilisation de la BHE chez des patients souffrant de glioblastome multiforme. Le but de cette étude clinique est d'ouvrir la BHE à l'aide d'ultrasons et de microbulles pour permettre à un cytotoxique, la doxorubicine, d'atteindre le glioblastome (Dasgupta et al., 2016). Il pourrait être intéressant de tester le passage de notre traceur au travers de la BHE en utilisant cette technique. Cela a été réalisé par Yang *et al* en 2015, en TEMP, avec des cellules de gliomes exprimant l'HSV1-tk greffées chez le rat, et la [¹²³I]-FIAU. Les résultats de cette étude ont montré que les cellules de gliomes exprimant la TK greffées *in vivo* pouvaient être visualisées par TEMP après sonoperméabilisation de la BHE jusqu'à 10 jours après l'implantation (Yang et al., 2015). En se référant aux études de captation *in vitro* que nous avons réalisées, pour obtenir une concentration de [¹⁸F]-FHBG dans le cerveau d'un rat environ égale à 555 kBq/mL, il faudrait que 1110 kBq de [¹⁸F]-FHBG traversent la BHE. Si on considère que 3% de la dose totale injectée traverse la BHE, il faudrait injecter par voie intraveineuse une dose totale de 37MBq, ce qui est réalisable.

Ainsi, l'amélioration de notre technique de suivi des cellules greffées intracérébrales nous permettrait d'assurer un suivi longitudinal non-invasif des cellules greffées sur une plus longue période. Ceci nous permettrait d'évaluer l'éventuelle migration des cellules, leur survie ainsi que leur potentielle cancérisation. En effet, la population de cellules transfectées sélectionnée ayant intégré le plasmide de manière stable, l'intégration de ce dernier s'est faite de façon aléatoire dans le génome. En cas d'intégration mutagène, les cellules pourraient alors devenir cancéreuses. Le suivi longitudinal du greffon est donc essentiel, pour appréhender ce phénomène. Dans l'éventualité d'une telle transformation, le ganciclovir pourrait alors être utilisé pour éliminer le greffon.



Conclusion

Un système d'imagerie performant nécessite une sensibilité suffisante pour détecter les cellules greffées même en faible nombre, et suffisamment de résolution spatiale pour déterminer précisément leur localisation, au sein du tissu ou de l'organe, dans lequel elles ont été greffées. Ceci est d'autant plus important lorsqu'il s'agit du cerveau, puisque la boîte crânienne qui l'entoure atténue grandement le signal émis.

Dans cette étude pilote, nous avons montré qu'il était possible de contrôler la qualité de la greffe de cellules intracérébrales (localisation, viabilité), grâce à l'imagerie TEP/CT de rats greffés avec des cellules Neuro2a exprimant un gène rapporteur, l'HSV1-tk. Nous avons également réussi à quantifier ces cellules *in vitro* et *in vivo*, avec des sensibilités comparables à celles observées dans la littérature. La sonde utilisée, la [¹⁸F]-FHBG, a été synthétisée dans notre centre, et l'optimisation de sa synthèse, nous a permis d'obtenir un rendement semblable à ceux rapportés dans différentes publications scientifiques.

La [¹⁸F]-FHBG traversant difficilement la BHE, le suivi longitudinal du greffon est difficilement envisageable par cette technique, sans utiliser un cathéter intracérébral. Cependant, les travaux prometteurs de nombreuses équipes sur la capacité des ultrasons à altérer temporairement cette barrière, pourraient permettre à notre traceur de parvenir jusqu'aux cellules. Le plus grand challenge sera donc de mettre au point un protocole d'altération temporaire de la BHE chez le rat par les ultrasons, afin de réitérer nos expérimentations, en injectant, cette fois-ci, la [¹⁸F]-FHBG par voie périphérique. Si la preuve est apportée que cet outil est performant *in vivo* pour le suivi longitudinal, nous pourrions appliquer cette technique en utilisant des cellules NDCs.

La capacité de suivre les cellules *in vivo*, après transplantation sur le même animal au cours du temps, nous permettra de comprendre le devenir des cellules greffées tout en minimisant le nombre d'animaux nécessaires. Ce type d'outil pourra, à long terme, améliorer la compréhension des mécanismes régissant le succès, ou l'échec de la thérapie cellulaire, porteuse de tant d'espoir dans le traitement de nombreuses pathologies.



Références bibliographiques (112)

- Alauddin, M.M., Conti, P.S., 1998. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. *Nucl. Med. Biol.* 25, 175–180.
- Alauddin, M.M., Gelovani, J.G., 2010. Radiolabeled nucleoside analogues for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 1617–1632.
- Alauddin, M.M., Shahinian, A., Gordon, E.M., Bading, J.R., Conti, P.S., 2001. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[(18)F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 42, 1682–1690.
- Al-Dosari, M.S., Gao, X., 2009. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* 11, 671–681. doi:10.1208/s12248-009-9143-y
- AP Bio The Blood Brain Barrier [WWW Document], n.d. . Emaze Present. URL <https://www.emaze.com/@AZOWFOCL> (accessed 3.5.17).
- Arlicot, N., 2014. Généralités RP 1.
- Balatoni, J.A., Doubrovin, M., Ageyeva, L., Pillarsetty, N., Finn, R.D., Gelovani, J.G., Blasberg, R.G., 2005. Imaging herpes viral thymidine kinase-1 reporter gene expression with a new 18F-labeled probe: 2'-fluoro-2'-deoxy-5-[18F]fluoroethyl-1-beta-d-arabinofuranosyl uracil. *Nucl. Med. Biol.* 32, 811–819. doi:10.1016/j.nucmedbio.2005.07.007
- Bartus, R.T., Elliott, P., Hayward, N., Dean, R., McEwen, E.L., Fisher, S.K., 1996. Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto-regulated, receptor-mediated system. *Immunopharmacology* 33, 270–278.
- Bazzani, R.P., Pringle, I.A., Connolly, M.M., Davies, L.A., Sumner-Jones, S.G., Schleeff, M., Hyde, S.C., Gill, D.R., 2016. Transgene sequences free of CG dinucleotides lead to high level, long-term expression in the lung independent of plasmid backbone design. *Biomaterials* 93, 20–26. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.029
- Berry, I., Gantet, P., 2014. Applications de la RMN, in: *Magnétostatique et RMN*. p. 89.
- Bonnin, F., 2014. Enjeux économiques et défis technologiques des biotechnologies : cas du transfert de gène en thérapie génique.
- Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., Rubanyi, G.M., 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J. Gene Med.* 6, 395–404. doi:10.1002/jgm.516
- Burgess, A., Huang, Y., Querbes, W., Sah, D.W., Hynynen, K., 2012. Focused ultrasound for targeted delivery of siRNA and efficient knockdown of Htt expression. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 163, 125–129. doi:10.1016/j.jconrel.2012.08.012
- Buvat, I., 2003. Imagerie fonctionnelle haute résolution des radiotraceurs [WWW Document]. *VIIIème Colloq. CNRS Rech. À Découv.* URL <http://www.guillemet.org/irene/coursem/CNRS2003.pdf> (accessed 2.2.17).
- Cao, Y.-A., Wagers, A.J., Beilhack, A., Dusich, J., Bachmann, M.H., Negrin, R.S., Weissman, I.L., Contag, C.H., 2004. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 221–226. doi:10.1073/pnas.2637010100
- Chao, F., Shen, Y., Zhang, H., Tian, M., 2013. Multimodality molecular imaging of stem cells therapy for stroke. *BioMed Res. Int.* 2013, 849819. doi:10.1155/2013/849819

- Chin, F.T., Namavari, M., Levi, J., Subbarayan, M., Ray, P., Chen, X., Gambhir, S.S., 2008. Semiautomated radiosynthesis and biological evaluation of [18F]FEAU: a novel PET imaging agent for HSV1-tk/sr39tk reporter gene expression. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 10, 82–91. doi:10.1007/s11307-007-0122-3
- Daadi, M.M., Hu, S., Klausner, J., Li, Z., Sofilos, M., Sun, G., Wu, J.C., Steinberg, G.K., 2013. Imaging neural stem cell graft-induced structural repair in stroke. *Cell Transplant.* 22, 881–892. doi:10.3727/096368912X656144
- Daadi, M.M., Li, Z., Arac, A., Grueter, B.A., Sofilos, M., Malenka, R.C., Wu, J.C., Steinberg, G.K., 2009. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1282–1291. doi:10.1038/mt.2009.104
- Dai, G., Levy, O., Carrasco, N., 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379, 458–460. doi:10.1038/379458a0
- Dasgupta, A., Liu, M., Ojha, T., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T., 2016. Ultrasound-mediated Drug Delivery to the Brain: Principles, Progress and Prospects. *Drug Discov. Today Technol.* 20, 41. doi:10.1016/j.ddtec.2016.07.007
- Denholt, C.L., Binderup, T., Stockhausen, M.-T., Poulsen, H.S., Spang-Thomsen, M., Hansen, P.R., Gillings, N., Kjær, A., 2011. Evaluation of 4-[18F]fluorobenzoyl-FALGEA-NH₂ as a positron emission tomography tracer for epidermal growth factor receptor mutation variant III imaging in cancer. *Nucl. Med. Biol.* 38, 509–515. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.11.003
- Deroose, C.M., Reumers, V., Debysier, Z., Baekelandt, V., 2009. Seeing genes at work in the living brain with non-invasive molecular imaging. *Curr. Gene Ther.* 9, 212–238.
- D'Hardemare, A., 2014. Développement de radiopharmaceutiques métallés.
- Disselhorst, J.A., Brom, M., Laverman, P., Slump, C.H., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., Gotthardt, M., Visser, E.P., 2010. Image-Quality Assessment for Several Positron Emitters Using the NEMA NU 4-2008 Standards in the Siemens Inveon Small-Animal PET Scanner. *J. Nucl. Med.* 51, 610–617. doi:10.2967/jnumed.109.068858
- Dollé, F., 2012. Radiopharmaceutiques marqués par des émetteurs de positons à vie brève.
- Elsinga, P.H., Hendrikse, N.H., Bart, J., Vaalburg, W., van Waarde, A., 2004. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1493–1503.
- Fan, C.-H., Ting, C.-Y., Liu, H.-L., Huang, C.-Y., Hsieh, H.-Y., Yen, T.-C., Wei, K.-C., Yeh, C.-K., 2013. Antiangiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment. *Biomaterials* 34, 2142–2155. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.048
- Fernandez-Gomez, F.J., Galindo, M.F., Gómez-Lázaro, M., Yuste, V.J., Comella, J.X., Aguirre, N., Jordán, J., 2005. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* 144, 528–537. doi:10.1038/sj.bjp.0706069
- Fischer, H., Gottschlich, R., Seelig, A., 1998. Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *J. Membr. Biol.* 165, 201–211.
- Furukawa, T., Lohith, T.G., Takamatsu, S., Mori, T., Tanaka, T., Fujibayashi, Y., 2006. Potential of the FES-hERL PET reporter gene system -- basic evaluation for gene therapy monitoring. *Nucl. Med. Biol.* 33, 145–151. doi:10.1016/j.nucmedbio.2005.07.013
- Gambhir, S.S., Barrio, J.R., Phelps, M.E., Iyer, M., Namavari, M., Satyamurthy, N., Wu, L., Green, L.A., Bauer, E., MacLaren, D.C., Nguyen, K., Berk, A.J., Cherry, S.R.,

- Herschman, H.R., 1999. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2333–2338.
- Gambhir, S.S., Bauer, E., Black, M.E., Liang, Q., Kokoris, M.S., Barrio, J.R., Iyer, M., Namavari, M., Phelps, M.E., Herschman, H.R., 2000. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2785–2790. doi:10.1073/pnas.97.6.2785
- Gambhir, S.S., Herschman, H.R., Cherry, S.R., Barrio, J.R., Satyamurthy, N., Toyokuni, T., Phelps, M.E., Larson, S.M., Balatoni, J., Finn, R., Sadelain, M., Tjuvajev, J., Blasberg, R., 2000. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia N. Y. N* 2, 118–138.
- Gantet, P., 2015. ED n°2 Biophysique PACES PURPAN.
- Gill, D.R., Smyth, S.E., Goddard, C.A., Pringle, I.A., Higgins, C.F., Colledge, W.H., Hyde, S.C., 2001. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1 α promoter. *Gene Ther.* 8, 1539–1546. doi:10.1038/sj.gt.3301561
- Herbst, F., Ball, C.R., Tuorto, F., Nowrouzi, A., Wang, W., Zavidij, O., Dieter, S.M., Fessler, S., van der Hoeven, F., Kloz, U., Lyko, F., Schmidt, M., von Kalle, C., Glimm, H., 2012. Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1014–1021. doi:10.1038/mt.2012.46
- Herschman, H.R., 2004. Noninvasive imaging of reporter gene expression in living subjects. *Adv. Cancer Res.* 92, 29–80. doi:10.1016/S0065-230X(04)92003-9
- Hyde, S.C., Pringle, I.A., Abdullah, S., Lawton, A.E., Davies, L.A., Varathalingam, A., Nunez-Alonso, G., Green, A.-M., Bazzani, R.P., Sumner-Jones, S.G., Chan, M., Li, H., Yew, N.S., Cheng, S.H., Boyd, A.C., Davies, J.C., Griesenbach, U., Porteous, D.J., Sheppard, D.N., Munkonge, F.M., Alton, E.W.F.W., Gill, D.R., 2008. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* 26, 549–551. doi:10.1038/nbt1399
- Ishiwata, K., Kawamura, K., Yanai, K., Hendrikse, N.H., 2007. In vivo evaluation of P-glycoprotein modulation of 8 PET radioligands used clinically. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 48, 81–87.
- Jacobs, R.E., Cherry, S.R., 2001. Complementary emerging techniques: high-resolution PET and MRI. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 621–629.
- Johnson, M., Karanikolas, B.D.W., Priceman, S.J., Powell, R., Black, M.E., Wu, H.-M., Czernin, J., Huang, S.-C., Wu, L., 2009. Titration of variant HSV1-tk gene expression to determine the sensitivity of 18F-FHBG PET imaging in a prostate tumor. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 50, 757–764. doi:10.2967/jnumed.108.058438
- Jordão, J.F., Ayala-Grosso, C.A., Markham, K., Huang, Y., Chopra, R., McLaurin, J., Hynynen, K., Aubert, I., 2010. Antibodies targeted to the brain with image-guided focused ultrasound reduces amyloid-beta plaque load in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e10549. doi:10.1371/journal.pone.0010549
- Kamphorst, W., de Boer, A.G., Gaillard, P.J., 2002. Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development. *J. Clin. Pathol.* 55, 158.
- Kang, J.H., Chung, J.-K., 2008. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 49 Suppl 2, 164S–79S. doi:10.2967/jnumed.107.045955

- Kroll, R.A., Neuwelt, E.A., 1998. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 42, 1083–1099; discussion 1099–1100.
- Laćan, G., Plenevaux, A., Rubins, D.J., Way, B.M., Defraiteur, C., Lemaire, C., Aerts, J., Luxen, A., Cherry, S.R., Melega, W.P., 2008. Cyclosporine, a P-glycoprotein modulator, increases [18F]MPPF uptake in rat brain and peripheral tissues: microPET and ex vivo studies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2256–2266. doi:10.1007/s00259-008-0832-z
- Lee, S.-W., Padmanabhan, P., Ray, P., Gambhir, S.S., Doyle, T., Contag, C., Goodman, S.B., Biswal, S., 2009. Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 295–302. doi:10.1002/jor.20736
- Liang, Q., Satyamurthy, N., Barrio, J.R., Toyokuni, T., Phelps, M.P., Gambhir, S.S., Herschman, H.R., 2001. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther.* 8, 1490–1498. doi:10.1038/sj.gt.3301542
- Li, Z., Conti, P.S., 2010. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1031–1051. doi:10.1016/j.addr.2010.09.007
- Li, Z., Suzuki, Y., Huang, M., Cao, F., Xie, X., Connolly, A.J., Yang, P.C., Wu, J.C., 2008. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 864–873. doi:10.1634/stemcells.2007-0843
- Löser, P., Jennings, G.S., Strauss, M., Sandig, V., 1998. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J. Virol.* 72, 180–190.
- Love, Z., Wang, F., Dennis, J., Awadallah, A., Salem, N., Lin, Y., Weisenberger, A., Majewski, S., Gerson, S., Lee, Z., 2007. Imaging of mesenchymal stem cell transplant by bioluminescence and PET. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 48, 2011–2020. doi:10.2967/jnumed.107.043166
- Massoud, T.F., Gambhir, S.S., 2003. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.* 17, 545–580. doi:10.1101/gad.1047403
- McCracken, M.N., Gschwend, E.H., Nair-Gill, E., McLaughlin, J., Cooper, A.R., Riedinger, M., Cheng, D., Nosala, C., Kohn, D.B., Witte, O.N., 2013. Long-term in vivo monitoring of mouse and human hematopoietic stem cell engraftment with a human positron emission tomography reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1857–1862. doi:10.1073/pnas.1221840110
- McDannold, N., Arvanitis, C.D., Vykhodtseva, N., Livingstone, M.S., 2012. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res.* 72, 3652–3663. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0128
- Miletic, H., Fischer, Y., Litwak, S., Giroglou, T., Waerzeggers, Y., Winkeler, A., Li, H., Himmelreich, U., Lange, C., Stenzel, W., Deckert, M., Neumann, H., Jacobs, A.H., von Laer, D., 2007. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 1373–1381. doi:10.1038/mt.sj.6300155
- Miyagawa, T., Gogiberidze, G., Serganova, I., Cai, S., Balatoni, J.A., Thaler, H.T., Ageyeva, L., Pillarsetty, N., Finn, R.D., Blasberg, R.G., 2008. Imaging of HSV-tk Reporter gene

- expression: comparison between [18F]FEAU, [18F]FFEAU, and other imaging probes. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 49, 637–648. doi:10.2967/jnumed.107.046227
- Moisan, A., Favre, I.M., Rome, C., Grillon, E., Naegele, B., Barbieux, M., De Fraipont, F., Richard, M.-J., Barbier, E.L., Rémy, C., Detante, O., 2014. Microvascular plasticity after experimental stroke: a molecular and MRI study. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 38, 344–353. doi:10.1159/000368597
- Müller, U., Ross, T.L., Ranadheera, C., Slavik, R., Müller, A., Born, M., Trauffer, E., Sephton, S.M., Scapozza, L., Krämer, S.D., Ametamey, S.M., 2013. Synthesis and preclinical evaluation of a new C-6 alkylated pyrimidine derivative as a PET imaging agent for HSV1-tk gene expression. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 3, 71–84.
- Nguyen, P.K., Riegler, J., Wu, J.C., 2014. Stem Cell Imaging: From Bench to Bedside. *Cell Stem Cell* 14, 431–444. doi:10.1016/j.stem.2014.03.009
- Oldfield, E.H., Ram, Z., Culver, K.W., Blaese, R.M., DeVroom, H.L., Anderson, W.F., 1993. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.* 4, 39–69. doi:10.1089/hum.1993.4.1-39
- Paans, A., 1997. Energies and Ranges of Positrons [WWW Document]. Positron Ranges - Harv. Univ. URL http://www.med.harvard.edu/jpnm/physics/isotopes/pos_range.html (accessed 2.4.17).
- Pardridge, W.M., 1986. Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr. Rev.* 7, 314–330. doi:10.1210/edrv-7-3-314
- Paterson, D.I., OMeara, E., Chow, B.J., Ukkonen, H., Beanlands, R.S., 2011. Recent advances in cardiac imaging for patients with heart failure. *Curr. Opin. Cardiol.* 26, 132–143. doi:10.1097/HCO.0b013e32834380e7
- Pathak, K., Keshri, L., Shah, M., 2011. Lipid nanocarriers: influence of lipids on product development and pharmacokinetics. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 28, 357–393.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Pham, Y.T., Gimenez, F., 2001. Capture, efflux et modulation du transport des médicaments au niveau cérébral. *J. Pharm. Clin.* 20, 52–63.
- Phelps, M.E., Hoffman, E.J., Mullani, N.A., Ter-Pogossian, M.M., 1975. Application of Annihilation Coincidence Detection to Transaxial Reconstruction Tomography. *J. Nucl. Med.* 16, 210–224.
- Pike, V.W., 2009. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 431–440. doi:10.1016/j.tips.2009.05.005
- Pitard, B., 2014. Nanocarriers for macromolecules.
- Ponde, D.E., Dence, C.S., Schuster, D.P., Welch, M.J., 2004. Rapid and reproducible radiosynthesis of [18F] FHBG. *Nucl. Med. Biol.* 31, 133–138.
- Qiao, H., Surti, S., Choi, S.R., Raju, K., Zhang, H., Ponde, D.E., Kung, H.F., Karp, J., Zhou, R., 2009. Death and proliferation time course of stem cells transplanted in the myocardium. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 11, 408–414. doi:10.1007/s11307-009-0222-3
- Rahmim, A., Zaidi, H., 2008. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl. Med. Commun.* 29, 193–207. doi:10.1097/MNM.0b013e3282f3a515
- Ramamoorthi, M., Narvekar, A., 2015. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 9, GE01–GE06. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394

- Raub, T.J., 2006. P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Mol. Pharm.* 3, 3–25.
- Reumers, V., Deroose, C.M., Krylyshkina, O., Nuyts, J., Geraerts, M., Mortelmans, L., Gijssbers, R., Van den Haute, C., Debysers, Z., Baekelandt, V., 2008. Noninvasive and quantitative monitoring of adult neuronal stem cell migration in mouse brain using bioluminescence imaging. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2382–2390. doi:10.1634/stemcells.2007-1062
- Rubin, L.L., Staddon, J.M., 1999. The Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11–28. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.11
- Sanchez-Crespo, A., 2013. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Appl. Radiat. Isot., Ga-68 Special Issue* 76, 55–62. doi:10.1016/j.apradiso.2012.06.034
- Schaller, B.J., Cornelius, J.F., Sandu, N., Buchfelder, M., 2008. Molecular imaging of brain tumors personal experience and review of the literature. *Curr. Mol. Med.* 8, 711–726.
- Schipper, M.L., Weber, A., Béhé, M., Göke, R., Joba, W., Schmidt, H., Bert, T., Simon, B., Arnold, R., Heufelder, A.E., Behr, T.M., 2003. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res.* 63, 1333–1338.
- Smanik, P.A., Liu, Q., Furminger, T.L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E.L., Jhiang, S.M., 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 339–345.
- Sokolova, V., Epple, M., 2008. Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 1382–1395. doi:10.1002/anie.200703039
- Strange, P.G., 1990. Aspects of the structure of the D2 dopamine receptor. *Trends Neurosci.* 13, 373–378. doi:10.1016/0166-2236(90)90022-3
- Strbian, D., Durukan, A., Pitkonen, M., Marinkovic, I., Tatlisumak, E., Pedrono, E., Abo-Ramadan, U., Tatlisumak, T., 2008. The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 153, 175–181. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.012
- Su, H., Forbes, A., Gambhir, S.S., Braun, J., 2004. Quantitation of cell number by a positron emission tomography reporter gene strategy. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 6, 139–148. doi:10.1016/j.mibio.2004.02.001
- Sullivan, E.V., Adalsteinsson, E., Sood, R., Mayer, D., Bell, R., McBride, W., Li, T.-K., Pfefferbaum, A., 2006. Longitudinal brain magnetic resonance imaging study of the alcohol-preferring rat. Part I: adult brain growth. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 1234–1247. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00145.x
- Syvänen, S., Lindhe, O., Palner, M., Kornum, B.R., Rahman, O., Långström, B., Knudsen, G.M., Hammarlund-Udenaes, M., 2009. Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 635–643. doi:10.1124/dmd.108.024745
- Tensaouti, F., Lotterie, J.A., Clarisse, P., Berry, I., 2008. Sysiphe-Neuroimaging software toolbox, in: *European Society for Magnetic Resonance Medicine and Biology 2008 Congress Oct.*
- Terrovitis, J., Stuber, M., Youssef, A., Preece, S., Leppo, M., Kizana, E., Schär, M., Gerstenblith, G., Weiss, R.G., Marbán, E., Abraham, M.R., 2008. Magnetic Resonance Imaging Overestimates Ferumoxide-Labeled Stem Cell Survival After Transplantation in the Heart. *Circulation* 117, 1555–1562. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732073

- Tjuvajev, J.G., Doubrovin, M., Akhurst, T., Cai, S., Balatoni, J., Alauddin, M.M., Finn, R., Bornmann, W., Thaler, H., Conti, P.S., Blasberg, R.G., 2002. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 43, 1072–1083.
- Tjuvajev, J.G., Stockhammer, G., Desai, R., Uehara, H., Watanabe, K., Gansbacher, B., Blasberg, R.G., 1995. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res.* 55, 6126–6132.
- Van Bree, J.B., de Boer, A.G., Danhof, M., Ginsel, L.A., Breimer, D.D., 1988. Characterization of an “in vitro” blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 1233–1239.
- Van Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J.E., Wolff, J., 2003. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* 144, 247–252. doi:10.1210/en.2002-220744
- Varma, N., Janic, B., Ali, M., Iskander, A., Arbab, A., 2011. Lentiviral Based Gene Transduction and Promoter Studies in Human Hematopoietic Stem Cells (hHSCs). *J. Stem Cells Regen. Med.* 7, 41–53.
- Vaysse, L., Conchou, F., Demain, B., Davoust, C., Plas, B., Ruggieri, C., Benkaddour, M., Simonetta-Moreau, M., Loubinoux, I., 2015. Strength and fine dexterity recovery profiles after a primary motor cortex insult and effect of a neuronal cell graft. *Behav. Neurosci.* 129, 423–434. doi:10.1037/bne0000067
- Vercouillie, J., 2014. Radiopharmaceutiques Partie I - Les émetteurs de positons.
- Waerzeggers, Y., Klein, M., Miletic, H., Himmelreich, U., Li, H., Monfared, P., Herrlinger, U., Hoehn, M., Coenen, H.H., Weller, M., Winkeler, A., Jacobs, A.H., 2008. Multimodal imaging of neural progenitor cell fate in rodents. *Mol. Imaging* 7, 77–91.
- Walther, M., Gebhardt, P., Grosse-Gehling, P., Würbach, L., Irmeler, I., Preusche, S., Khalid, M., Opfermann, T., Kamradt, T., Steinbach, J., Saluz, H.-P., 2011. Implementation of ⁸⁹Zr production and in vivo imaging of B-cells in mice with ⁸⁹Zr-labeled anti-B-cell antibodies by small animal PET/CT. *Appl. Radiat. Isot.* 69, 852–857. doi:10.1016/j.apradiso.2011.02.040
- Wasungu, L., Hoekstra, D., 2006. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 116, 255–264. doi:10.1016/j.jconrel.2006.06.024
- Waterhouse, R.N., 2003. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 5, 376–389.
- Wolfs, E., Verfaillie, C.M., Van Laere, K., Deroose, C.M., 2015. Radiolabeling strategies for radionuclide imaging of stem cells. *Stem Cell Rev.* 11, 254–274. doi:10.1007/s12015-014-9575-3
- Wu, J.C., Chen, I.Y., Sundaresan, G., Min, J.-J., De, A., Qiao, J.-H., Fishbein, M.C., Gambhir, S.S., 2003. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography. *Circulation* 108, 1302–1305. doi:10.1161/01.CIR.0000091252.20010.6E
- Yaghoubi, S., Barrio, J.R., Dahlbom, M., Iyer, M., Namavari, M., Satyamurthy, N., Goldman, R., Herschman, H.R., Phelps, M.E., Gambhir, S.S., 2001. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 42, 1225–1234.

- Yaghoubi, S.S., Campbell, D.O., Radu, C.G., Czernin, J., 2012. Positron emission tomography reporter genes and reporter probes: gene and cell therapy applications. *Theranostics* 2, 374–391. doi:10.7150/thno.3677
- Yaghoubi, S.S., Gambhir, S.S., 2006. Measuring herpes simplex virus thymidine kinase reporter gene expression in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2137–2142. doi:10.1038/nprot.2006.334
- Yaghoubi, S.S., Jensen, M.C., Satyamurthy, N., Budhiraja, S., Paik, D., Czernin, J., Gambhir, S.S., 2009. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 6, 53–58. doi:10.1038/nncponc1278
- Yang, F.-Y., Chang, W.-Y., Chen, J.-C., Lee, L.-C., Hung, Y.-S., 2014. Quantitative assessment of cerebral glucose metabolic rates after blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound using FDG-MicroPET. *NeuroImage* 90, 93–98. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.12.033
- Yang, F.-Y., Chang, W.-Y., Lin, W.-T., Hwang, J.-J., Chien, Y.-C., Wang, H.-E., Tsai, M.-L., 2015. Focused ultrasound enhanced molecular imaging and gene therapy for multifusion reporter gene in glioma-bearing rat model. *Oncotarget* 6, 36260–36268. doi:10.18632/oncotarget.5389
- Yew, N.S., Zhao, H., Wu, I.H., Song, A., Tousignant, J.D., Przybylska, M., Cheng, S.H., 2000. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 1, 255–262. doi:10.1006/mthe.2000.0036
- Yilmaz, A., Rösch, S., Klingel, K., Kandolf, R., Helluy, X., Hiller, K.-H., Jakob, P.M., Sechtem, U., 2013. Magnetic resonance imaging (MRI) of inflamed myocardium using iron oxide nanoparticles in patients with acute myocardial infarction - preliminary results. *Int. J. Cardiol.* 163, 175–182. doi:10.1016/j.ijcard.2011.06.004
- Zhao, Z., Yu, Q., Mou, T., Liu, C., Yang, W., Fang, W., Peng, C., Lu, J., Liu, Y., Zhang, X., 2014. Highly Efficient One-Pot Labeling of New Phosphonium Cations with Fluorine-18 as Potential PET Agents for Myocardial Perfusion Imaging. *Mol. Pharm.* 11, 3823–3831. doi:10.1021/mp500216g

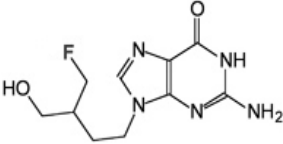
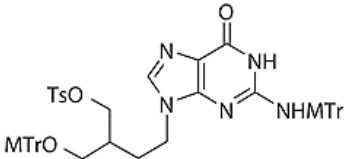
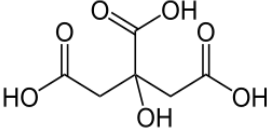
Annexes

Annexe 1. Synthèse de la [¹⁸ F]-FHBG.....	95
Annexe 1.1. Matières premières utilisées	95
Annexe 1.2. Interface graphique du module de synthèse	96
Annexe 1.3. Interface graphique des paramètres mesurés lors d'une synthèse	96
Annexe 1.4. Schéma du procédé de fabrication de la [¹⁸ F]-FHBG d'après Alauddin, Nuclear Medicine and Biology, 1998(Alauddin and Conti, 1998)	97
Annexe 1.5. Check-list de vérification avant le lancement de la synthèse	98
Annexe 2. Transfection des cellules et sélection de clones stables.....	99
Annexe 2.1. Protocole de transfection des lignées Neuro 2A	99
Annexe 2.2. Plasmide utilisé contenant le gène HSV1-tk	100
Annexe 3. Schéma récapitulatif de l'étude de captation cellulaire de [¹⁸ F]-FHBG faisant varier le temps d'incubation	101

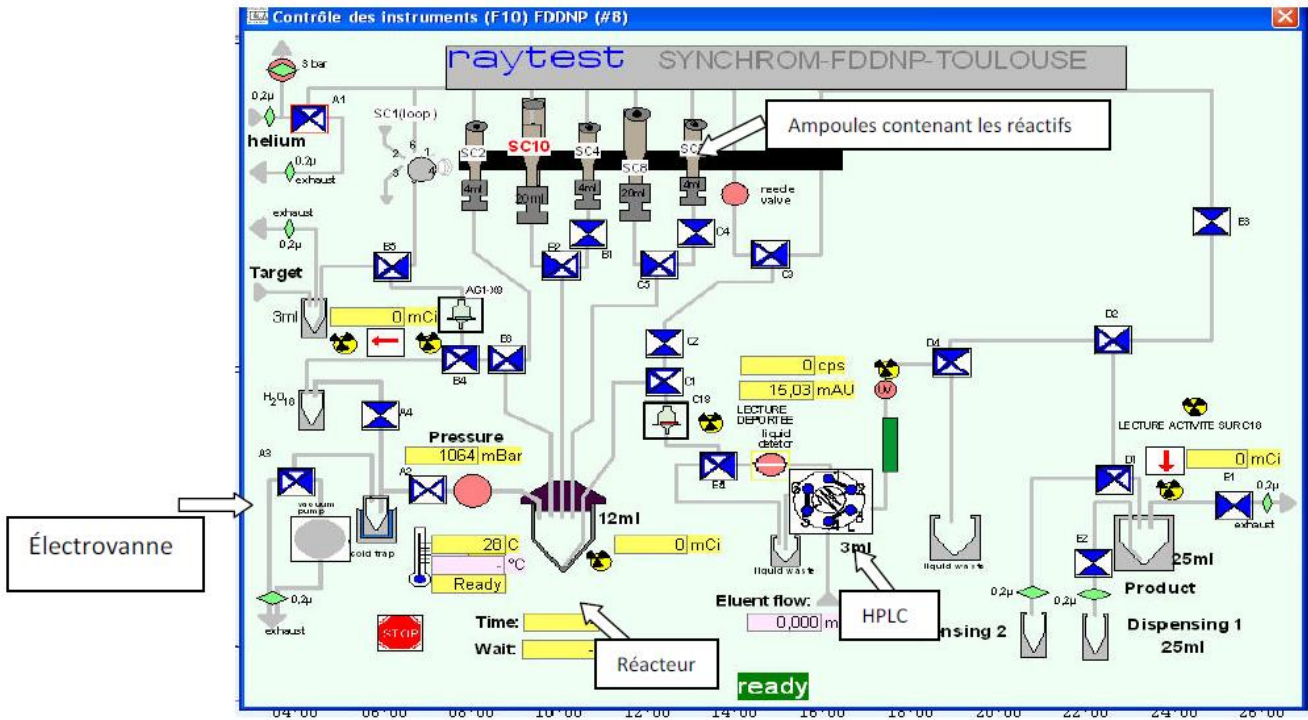


Annexe 1. Synthèse de la [¹⁸F]-FHBG

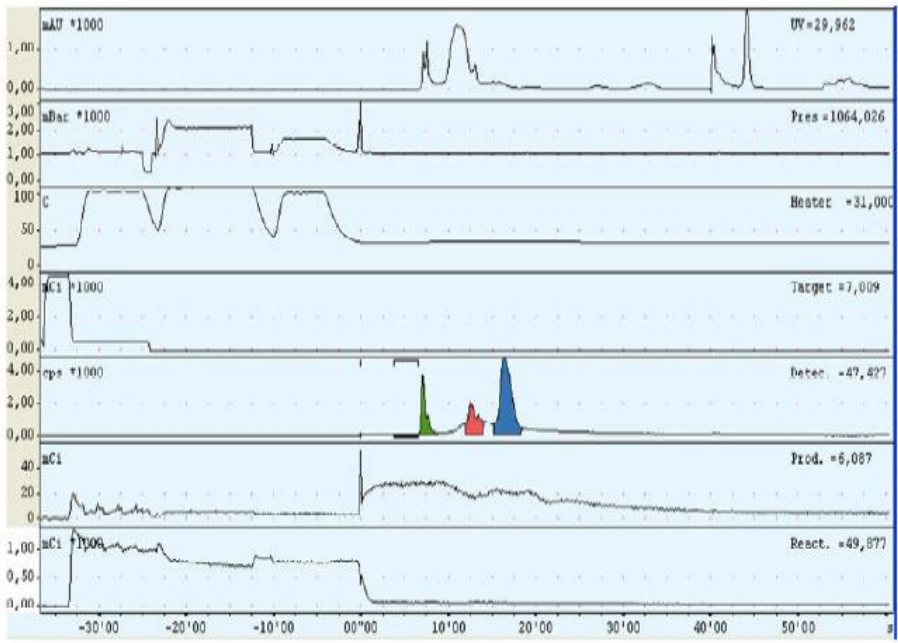
Annexe 1.1. Matières premières utilisées

Nom	Composition	Structure	Fabricant
[¹⁹ F]-FHBG Référence standard du [¹⁸ F]-FHBG	9-(4-[¹⁹ F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine		ABX Advanced Biochemical Compounds Radeberg - Germany
Tosyl-FHBG Précurseur de synthèse du [¹⁸ F]-FHBG	N2, monomethoxytrityl-9-[4-(tosyl)-3-monomethoxytrityl-methylbutyl]guanine		ABX
Eluant pour QMA	22 mg Kryptofix 2.2.2 (4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-(8.8.8)hexacosane), 7 mg de carbonate de potassium, 0,3 mL d'eau et 0,3mL d'acétonitrile	Kryptofix : Carbonate de potassium : K ₂ CO ₃ Acétonitrile : CH ₃ CN	ABX
Acétonitrile Dry (pour la dilution du précurseur)	-	CH ₃ CN	ABX
Acide Chlorhydrique	-	HCl	Merck
Soude	Hydroxyde de sodium	NaOH	Cooper
Acide citrique	acide 3-carboxy-3-hydroxypentanedioïque		Cooper
Acétonitrile	-	CH ₃ CN	Fisher Scientific UK
EPPI	-	H ₂ O	Baxter Healthcare SA
Solution d'acétate de sodium	Acétate de sodium 0,1M à 13,6g/L, EPPI	C ₂ H ₃ NaO ₂ , 3H ₂ O	Cooper (Acétate de sodium cristallisé)
Ethanol absolu	-	C ₂ H ₆ O	VWR International

Annexe 1.2. Interface graphique du module de synthèse

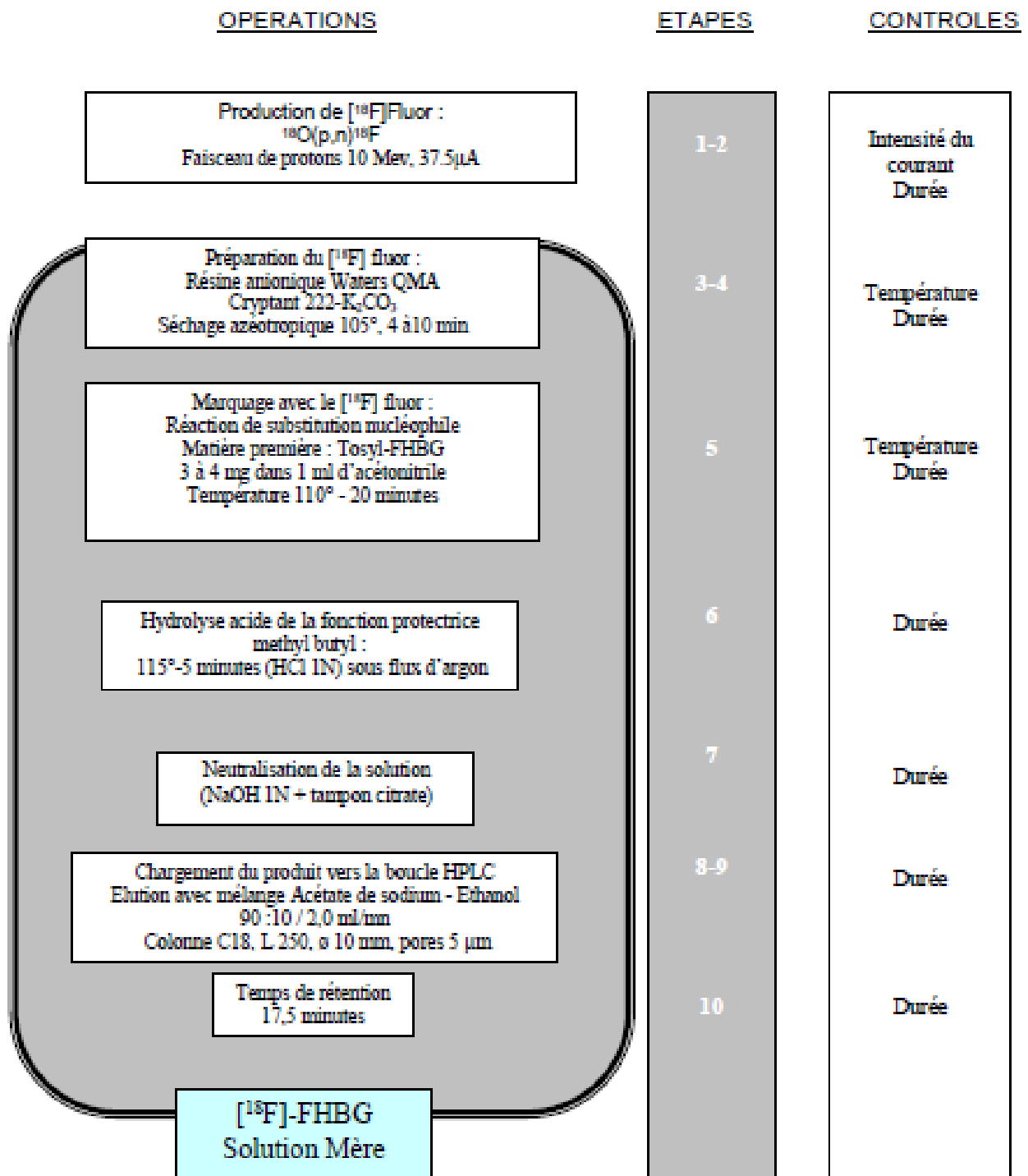


Annexe 1.3. Interface graphique des paramètres mesurés lors d'une synthèse




- Détecteur UV HPLC
- Pression dans le réacteur
- température dans le réacteur
- Activité initiale
- Détecteur gamma HPLC
- Activité dans le « product »
- Activité dans le réacteur

Annexe 1.4. Schéma du procédé de fabrication de la [¹⁸F]-FHBG d'après Alauddin, Nuclear Medicine and Biology, 1998(Alauddin and Conti, 1998)



Annexe 1.5. Check-list de vérification avant le lancement de la synthèse

 <p>RADIOPHARMACIE CENTRE TEP</p>	<h3>CHECK LIST SYNTHÈSE FHBG</h3>	<p>Code doc : FECLMISO-03 Auteur : ASB Validé par : Version : 1 Date d'application : Page 1 / 1</p>
--	-----------------------------------	--

	Manipulation à effectuer	cocher si OK
1	Vérification concordance montage automate et interface Gina pour FMISO	
2	Vérification bouteille d'hélium et lecture de la pression (>100 mBars)	
3	Vérification bouteille d'air comprimé et lecture de la pression (bouteille à l'extérieur)	
4	Rinçage acétone : vérification détecteur de liquide OK.	
5	Vérification pas de fuite quand réacteur en pression	
6	Vidange des poubelles (HPLC et générale)	
7	Préparation des réactifs (dans des tubes à hémolyse en verre) - HCl 1N : -320 µl D'HCL 30% dans 3.68 ml d'EPPI - NaOH 2N : - 332 mg dans 4 ml d'EPPI (volume à adapter en fonction de la pesée) - Citrate de sodium 0.5 M : -588 mg dans 4 ml d'EPPI →test du pH : 900 µL HCL + 360 µL NaOH + 1ml Citrate = PH basique > 9	
8	Mise en place du solvant HPLC FHBG (10 % ethanol, 90 % d'acétate de sodium) Mise en place la colonne semi préparative (ASTRA) dédiée FHBG.	
9	En position load : remplissage de SC 1 avec 0.6 ml de Krytofix puis position inject!!!	
10	Remplissage SC 2 : 4 mg de tosyl-FHBG dans 1 ml d'ACN dry	
11	Remplissage SC 3 : 900 µL D'HCL 1N	
12	Remplissage SC4 : 1mL de citrate de sodium 0.5 M + 360 µL de NaOH 2N	
13	Remplissage SC 5 : 5 mL d'acétonitrile	
14	Vérification fermeture hermétique des flacons SC	
15	Mise en place de la QMA	
16	Vérification aiguille de récupération et tuyau d'arrivée fluor sont bien dans « target »	
17	Vérification flacon de récupération de l'eau lourde OK.	
18	Remplissage du Dewar avec de l'azote liquide	
19	Fermeture à clef de la hotte et vérification de la dépression : supérieure à 100 Pa	



Annexe 2. Transfection des cellules et sélection de clones stables

Annexe 2.1. Protocole de transfection des lignées Neuro 2A

Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent Protocol 2013

Lipofectamine® LTX DNA Transfection Reagents Protocol

Transfect cells according to the following table. Use the indicated volume of DNA and PLUS™ Reagent with each of the four volumes of Lipofectamine® LTX. Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (6-well) transfections, and accounts for pipetting variations. For even less toxicity, reduce the amount of DNA-lipid complex to the cells, or reduce the amount of DNA used to make complexes.

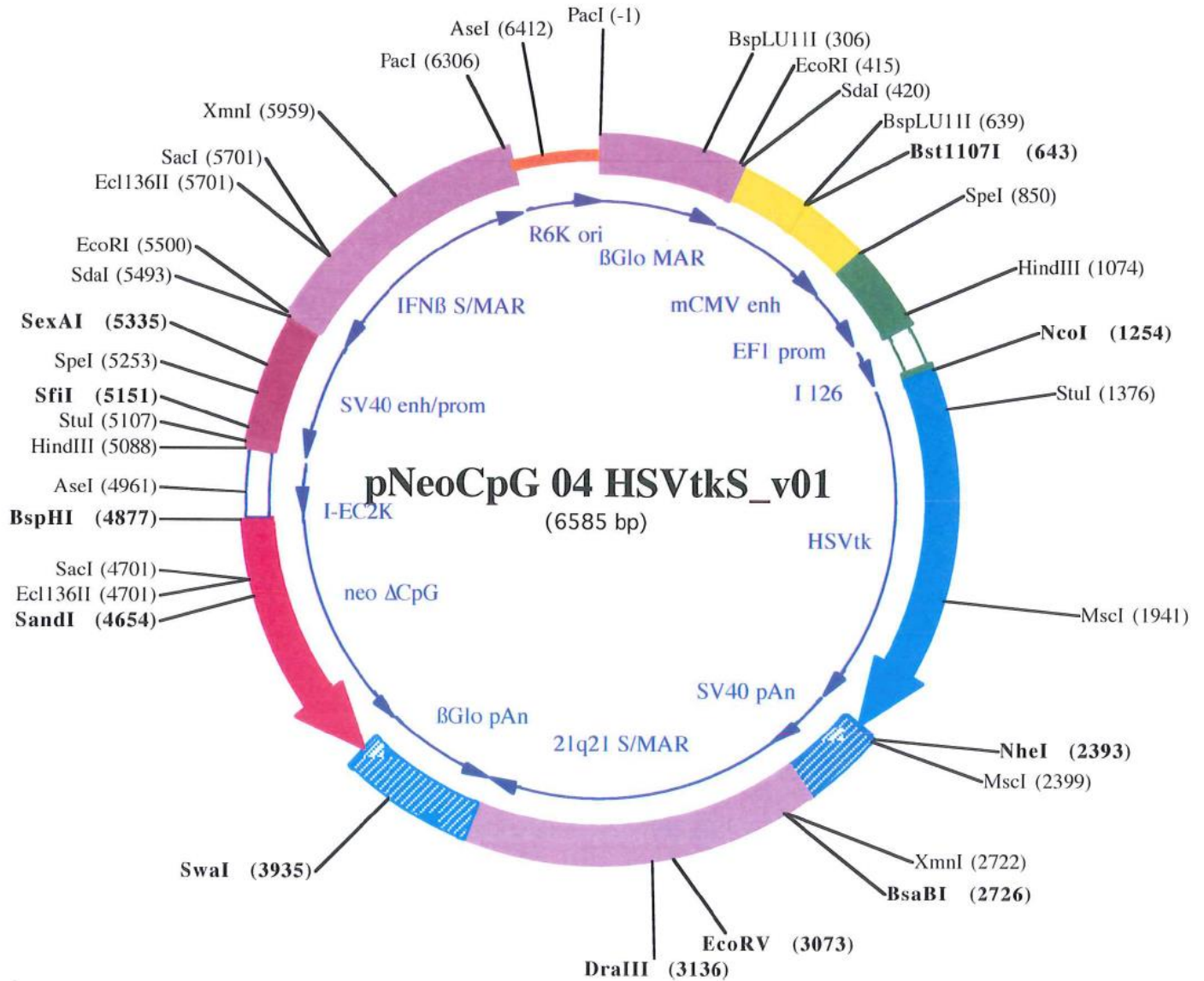
Timeline		Steps	Procedure Details			
Day 0	1	Seed cells to be 70-90% confluent at transfection	Component	96-well	24-well	6-well
	2	Dilute Lipofectamine® LTX Reagent in Opti-MEM® Medium	Adherent cells	1-4 × 10 ⁴	0.5-2 × 10 ⁵	0.25-1 × 10 ⁶
Day 1	3	Dilute DNA in Opti-MEM® Medium, then add PLUS™ Reagent	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4
	4	Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® LTX Reagent (1:1 ratio)	Lipofectamine® LTX Reagent	1, 1.5, 2, 2.5 µL	2, 3, 4, 5 µL	6, 9, 12, 15 µL
	5	Incubate	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL
	6	Add DNA-lipid complex to cells	DNA (0.5-5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg
Day 2-4	7	Visualize/analyze transfected cells	PLUS™ Reagent	2.5 µL	5 µL	14 µL
			Diluted DNA (with PLUS™ Reagent) Total	25 µL	50 µL	150 µL
			Diluted Lipofectamine® LTX Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
			Incubate for 5 minutes at room temperature.			
			Component	96-well	24-well	6-well
			DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
			Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng
			Final Lipofectamine® LTX Reagent used per well	0.2-0.5 µL	1.0-2.5 µL	5.0-12.5 µL
			Incubate cells for 1-3 days at 37°C. Then, analyze transfected cells.			

-2-

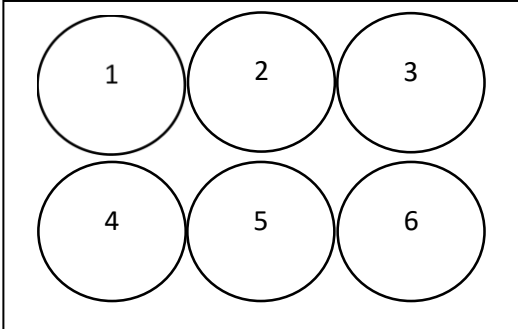
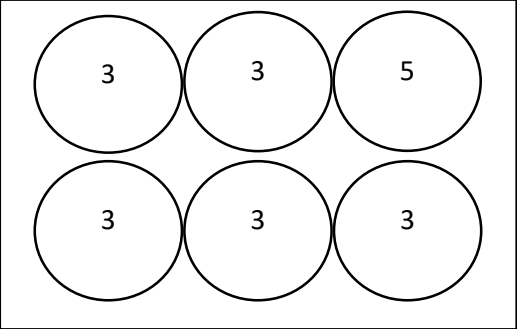
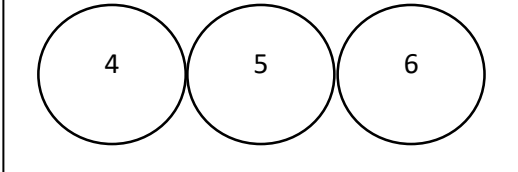
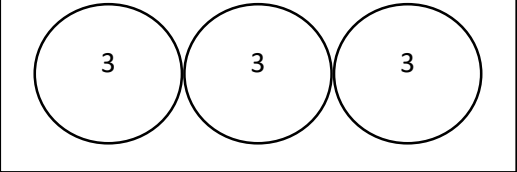
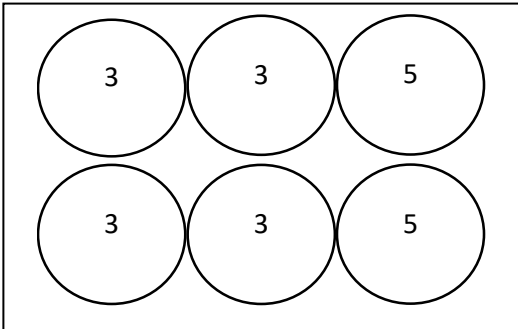
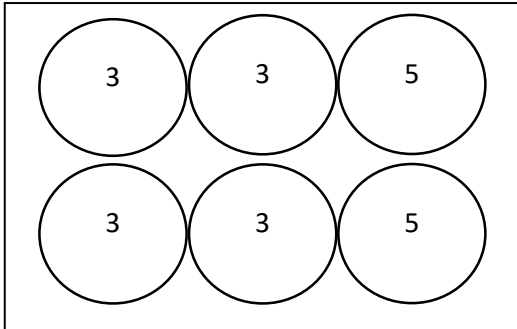
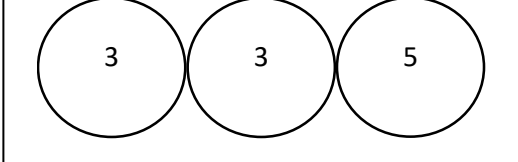
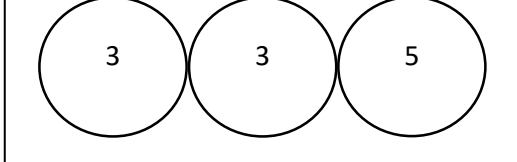
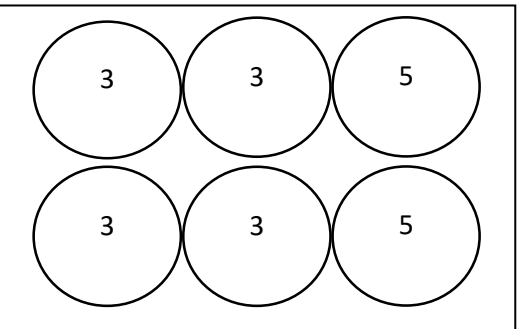
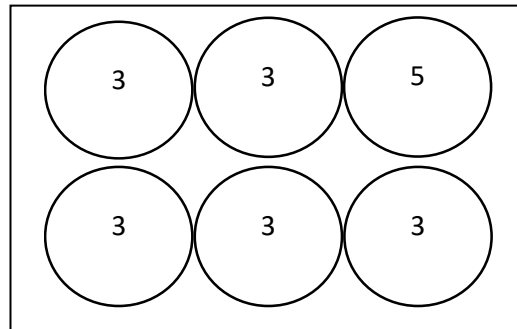
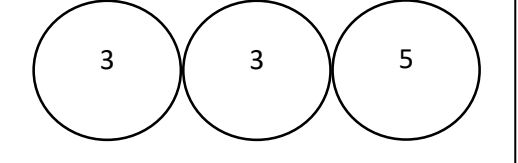
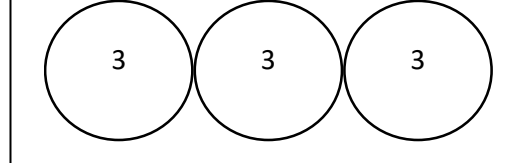
For support, visit www.lifetechnologies.com/support.



Annexe 2.2. Plasmide utilisé contenant le gène HSV1-tk



Annexe 3. Schéma récapitulatif de l'étude de captation cellulaire de [¹⁸F]-FHBG faisant varier le temps d'incubation

Temps d'incubation (h)	Dose (kBq / mL)	Cellules transfectées	Cellules contrôles
1	115	Plaque 1 	Plaque 2 
	555		
2	115	Plaque 3 	Plaque 4 
	555		
3	115	Plaque 5 	Plaque 6 
	555		



Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Utilisation de la [¹⁸F]-FHBG comme outil de quantification de cellules greffées intracérébrales exprimant l'HSV1-tk

Objectifs : La thérapie cellulaire constitue une thérapie innovante en neurologie afin de compenser un dommage tissulaire. Pour assurer le suivi des cellules greffées intracérébrales, nous avons étudié la faisabilité d'une technique d'imagerie moléculaire utilisant un gène rapporteur codant pour une thymidine kinase, l'HSV1-tk, et sa sonde, la [¹⁸F]FHBG permettant de visualiser l'expression de cette enzyme.

Matériels et méthodes : Une lignée stable de cellules neurales exprimant l'HSV1-tk a été développée grâce à un vecteur d'expression de mammifère optimisé permettant l'expression à long terme du transgène. Après incubation avec la [¹⁸F]FHBG selon des paramètres définis, des gammes de calibration allant de 10 000 à 3 000 000 cellules Neuro2A exprimant la TK (Neuro2a-TK) ont été analysées et comptées grâce à un compteur ou une caméra TEP/CT. En parallèle, différentes quantités de cellules Neuro2a-TK pré-marquées avec la [¹⁸F]FHBG ont été greffées chez un modèle de rat ayant subi au préalable une lésion cérébrale par injection stéréotaxique de malonate. L'acquisition des images des rats greffés a également été réalisée grâce à une caméra TEP/CT. L'analyse et la quantification des données a été réalisée avec le logiciel Sisyphe sur des images fusionnées.

Résultats : Le taux de captation de [¹⁸F]FHBG par les cellules est d'environ 2.52 % (n = 9). L'analyse des gammes de calibration *in vitro* (n=12) et *in vivo* (n= 5) montre une parfaite corrélation entre le nombre de cellules et l'intensité du signal même après la greffe intracérébrale des cellules. La calibration *in vivo*, a permis de compter jusqu'à 50 000 cellules. Ces études ont également permis la validation du protocole d'injection stéréotaxique.

Conclusion : Ce type d'outil permettra le suivi longitudinal du greffon, de la viabilité des cellules mais aussi leur quantification et l'appréciation de leur biodistribution plusieurs semaines après leur injection intracérébrale.

Mots-clés : Thérapie cellulaire, Imagerie moléculaire, [¹⁸F]FHBG, Tomographie à émission de positons (TEP)

Use of [¹⁸F]-FHBG as a tool for quantifying intracerebral graft cells expressing HSV1-tk

Purpose: Cell transplantation is an innovative therapeutic approach after brain injury to compensate tissue damage. To monitor intracerebrally grafted cells, we have explored the feasibility of a molecular imaging approach using a gene encoding thymidine kinase HSV1-TK and [¹⁸F]FHBG as a reporter probe to image the expression of this enzyme.

Methods: A stable neuronal cell line expressing HSV1-TK was developed with an optimised mammalian expression vector to ensure a long-term expression of the transgene. After incubation [¹⁸F]FHBG under defined parameters, calibration ranges from 10 000 to 3 000 000 Neuro2A-TK cells were analysed in a counter or by PET-camera. In parallel, graft procedure with different quantities of [¹⁸F]FHBG prelabelled Neuro2A-TK cells was tested in rat brain injury model induced by stereotaxic injection of malonate toxin. Image acquisition of rats was then also performed with PET/CT camera. Data analysis and quantification was performed with homemade software (Sisyphe) on co-registered image.

Results: [¹⁸F]FHBG cell uptake rate was around 2.52 % (n = 9). Calibration range analysis *in vitro* (n=12) and *in vivo* (n= 5) show a perfect linear correlation and reproducibility between the number of cells and the signal intensity even after intracerebral cell graft. *In vivo*, calibration allowed to determine the quantities of grafted cells up to 50 000 cells. These acquisitions also permitted the validation of stereotaxic injection quality.

Conclusion: This kind of approach will allow longitudinal graft monitoring to quantify cell viability and biodistribution several weeks after intracerebral injection.

Keywords : Cell therapy, Molecular imaging, [¹⁸F]FHBG, Positron emission tomography (PET)

