

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N° 3334

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

Tenant lieu de

MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

présentée et soutenue publiquement

le 15 septembre 2017

par

François MOCQUOT

né(e) le 31 août 1990, à Migennes

IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA NEURO-INFLAMMATION

Mise en place et optimisation de la synthèse d'un médicament
expérimental : le [^{18}F]DPA-714

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX

M. le Docteur Mathieu ALONSO

M. le Docteur Jean-André Mathieu TAFANI

M^{me} le Docteur Anne-Sophie SALABERT

M. le Docteur Zoubeir RAMJAUN

Président

Directeur de Thèse

Juge

Juge

Juge





Thèse d'exercice

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N° 3334

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

Tenant lieu de

MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

présentée et soutenue publiquement

le 15 septembre 2017

par

François MOCQUOT

né(e) le 31 août 1990, à Migennes

IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA NEURO-INFLAMMATION

Mise en place et optimisation de la synthèse d'un médicament
expérimental : le [¹⁸F]DPA-714

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX

M. le Docteur Mathieu ALONSO

M. le Docteur Jean-André Mathieu TAFANI

M^{me} le Docteur Anne-Sophie SALABERT

M. le Docteur Zoubeir RAMJAUN

Président

Directeur de Thèse

Juge

Juge

Juge





Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
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

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE
------------------	-------------

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
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
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE - BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin (01.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE



LAVERDET Betty	(1.09.2016	au	31.08.2017)
	PHARMACIE GALENIQUE		
PHAM Thanh Nhat	(1.09.2016	au	31.08.2017)
	CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE		

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de lire et commenter ce travail : le Pr Saint-Marcoux, le Dr Alonso, Dr Tafani, le Dr Salabert et le Dr Ramjaun.

Au Pr Franck Saint-Marcoux : Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse.

Au Dr Mathieu Alonso (remerciements officiels) : Merci d'avoir accepté de m'encadrer dans la réalisation de ce travail et d'avoir partagé ton expérience radiopharmaceutique durant ces trois dernières années.

Au Dr Mathieu Tafani : merci de m'avoir accueilli dans ton unité de Radiopharmacie et de m'avoir donné goût à cette belle discipline. Je garde en mémoire les enseignements principaux :

- « Non mi rompa le palle ! »
- « Grossièreté OUI, vulgarité NON ! »

Un sincère merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Au Dr Anne-Sophie Salabert : merci pour ta gentillesse quotidienne et ton aide précieuse dans la réalisation de ce manuscrit.

Au Dr Zoubair Ramjaun : un grand merci pour avoir accepté d'être membre de mon jury !

À mes parents : merci pour votre générosité et votre soutien indéfectible qui m'ont permis de mener à bien mes études de pharmacie. Je ne vous remercierai jamais assez.

À ma sœur Pauline : merci de me supporter depuis maintenant 21 ans et 364 jours, je te souhaite le meilleur pour cette fin d'année 2017, en espérant ardemment que tu rejoignes les rangs des internes l'année prochaine.

À Charlotte Fontan, merci de m'avoir initié le temps de trois semaines aux bases de la radiopharmacie.

À Valérie Pottier : merci Valou, première chef de Ranguel, pour ce stage passé à tes côtés et pour ta bonne humeur.

À mes co-internes :

- Marie : merci pour les coups de pouce et les conseils, que ce soit dans la rédaction de la thèse ou les formalités administratives, et de m'avoir libéré du temps dans ces dernières semaines de rédaction.
- Inès : désolé encore pour les journées à Ranguel où tu as dû cohabiter avec Mathieu et moi. Merci d'avoir tenu le coup et de t'être sortie de cette situation Inès-tricable.

À Nicolas « Mercedes Janine Toufika Rachida » Packer, dit « la cagole bordelaise », le plus fou des PPH (Préparateur Psychopathe Hygiéniste) : merci pour tes imitations, ta bonne



humeur, ton pète au casque que ce soit à la pause-café ou à la cellule. J'espère que tu surmonteras le départ de notre cher FX.

À François-Xavier Dubrulle, dit « la cagole coréenne », merci de ta gentillesse et merci pour avoir autant contribué à ma formation pratique ! J'espère que tu te régales comme il se doit à Thaïti. Je n'ai qu'un regret : ne pas avoir fait un tour dans la Merco Benz-benz-benz.

Merci également à tous les autres préparateurs de la radiopharmacie actuels et anciens : Bérengère, Laetitia, Marie, Émilie, Madeline, Céline, Jamel, Cécile, Farid ainsi qu'à leur cadre Marie-Blanche.

Un merci général à l'équipe de Radiopharmacie toulousaine, pour l'ambiance chaleureuse et familiale qui règne dans cette unité, ce fût un réel plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie le Professeur Payoux et le Professeur Berry de m'avoir accueilli dans leurs services de Médecine Nucléaire de Purpan et de Ranguel, ainsi que tous les manipulateurs radio avec qui je travaillais au quotidien.

À Mathieu Alonso (remerciements moins officiels) :

Sache que j'ai beaucoup ri quand j'ai écrit tes remerciements officiels ! Tu es incontestablement le chef le plus intelligent/taré que je n'ai jamais eu. Un sincère merci pour tes encouragements/insultes et pour ces semestres passés à tes côtés à la radiopharmacie/au baby-foot. Ce fût pour ma part un réel plaisir de (presque) travailler avec toi.

Je remercie pour leur intelligence et leur professionnalisme mes associés Margaux Lafaurie et Antoine Lanneluc, membres actifs du bureau de l'Amour, l'association de malfaiteurs que la PUI de Limoges ne regrettera jamais.

À Pieeeeeeeeeeeeeerre Leduc, monsieur Hygiène, fier habitant de Castle Red : merci pour ton accueil chaleureux à Limoges et pour toutes les soirées débiles, EVI, AG ... qui ont suivi à Toulouse, Brive, Bordeaux, Clermont et qui continueront je l'espère !!!

À Arnaud Veret « Le guaire » : merci pour ces années de chibraquerie, ta non-prise de tête et ta finesse légendaire. Les rendez-vous aux Tilleuls me manqueront !

À Jules Voinçon : merci pour ces sessions de rap assassin sur la terrasse de l'internat ainsi que pour ton trash-talk au baby-foot, déjà insupportable il y a 3 ans de cela.

À Guillaume Rousset « Guigui » : merci pour tes vérités dérangeantes, tes anecdotes de Lozère, ton hospitalité paloise et tes « coqs à l'âne ».

À Félicien Le Louedec, le mec qui est passé de l'écharpe rouge communiste à la casquette Ünkut : merci d'avoir fait partager un peu de ton génie et beaucoup de ta connerie lors de ces années d'internat. Ça me manquera. Bref, pas l'temps pour les regrets. Bonne continuation OKLM et garde la pêche. IZI.

À Damien Sémély « Cubi » : merci pour les « dégagements » que tu as su offrir lors notre stage de pharmacie clinique à Ranguel.



À Barnabé Daniau « Barni » : merci pour les roustes infligées au baby, un énorme merci (je pense que l'ensemble des internes toulousains sont d'accord avec moi) pour l'implantation de la tireuse à l'internat, la TK coulant à flot et les gueules de bois qui ont suivi. Enfin un énorme merci à toi et Bérangère pour l'accueil et l'hébergement en Nouvelle-Calédonie.

À Julien Costes, le coloc' de Sceaux ! : Je regrette encore cette soirée où je t'ai empêché de feuler sur les flics à Châtelet-les Halles en sortant de ce bar. Ma carrière de Youtubeur aurait pris son envol ce soir-là... Un grand merci pour toute l'intelligence qui émane de toi.

À mes anciennes co-internes de l'UPCO : Théa, Maud, Marie-Ève, Audrey, Marine, Marion et Adeline, désolé pour le bruit et merci d'avoir tenu le coup. On n'a peut-être pas fait l'unanimité mais on aura quand même bien rigolé. Un merci particulier à Adeline Jullien pour tous les noms d'oiseaux dont tu m'as qualifié et pour les points proctologiques quotidiens : j'ai enfin trouvé quelqu'un qui en parlait plus que moi (et merci Maud de t'être jointe à nous en deuxième partie de stage).

À Audrey Martel : merci Geneu pour ta présence en tant que co-interne, puis ta disponibilité en tant que chef à l'IUC.

Merci également à : Julien Guillemaud, Serri Traoé, Jean Gallot-Lavallée, Mireille Sabatier, Kévin Rouchette, Alice-Anne Janin, Pierre Laffite, Sophie Vandewoestyne, Caroline Miguet « P'tit Bazar », Quentin Dardonville (Pan !!!), Loïc Fiévet (Uuussss !!!), Marion Vancassel, M'sieur Duguet, Marine Mazon, Chloé Danet, Laura Bertrand, Thibaut Jamme, Mikel Arabit, Camille Merienne, Carlito, Anne-Sophie Vattier.

Merci également aux copains de la fac : Bastian, Thomas et Édouard.

Un grand merci à tous les préparateurs de l'UPCO et des essais cliniques : Elsa, Emeline, Mélina, Sandrine, Pauline, Sergen, Céline, Thomas etc... pour l'ambiance et les coups de gueule, et particulièrement à Hugo pour les petites chansonnettes poussées pendant les runs de robot.

Un merci également aux cadres de l'IUC Yann et Nelson pour les Soccers 5 à la sortie du travail.

À l'équipe de la stérilisation : Sophie Raignoux « Miss Quality », Laurent Hauviller « Monsieur H » ou « Ma gueule », Émilie Gardes, Mathieu Maupiler, Annie, Patrice, Serge et Éric : merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. J'espère qu'on ne vous a pas trop épuisés avec le Guigui.

Enfin je souhaite remercier la personne la plus importante à mes yeux, Margaux Delforge, « my baby » : un énorme merci pour le soutien et pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien. Je t'aime à la folie.



Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver
Pierre Dac



Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$: Gradient électrochimique
 μA : microampère
[^{18}F]AV-45 : Florbetapir
ACN : Acétonitrile
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
AIF : Apoptosis inducing factor
AMS : Amyotrophie musculaire spinale
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ANT : Transporteur de l'adénine nucléotidique
Apaf-1 : Apoptosis activating factor 1
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ASN : Agence de sûreté nucléaire
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATUn : Autorisation temporaire d'utilisation
BDNF : Brain derived neurotrophic factor
 Ca^{2+} : Ion calcium
CCM : Chromatographie sur couche mince
CPP : Comité de protection des personnes
CRAC : Cholesterol recognition amino acid consensus"
CYP : Cytochrome p450
Cyt-c : Cytochrome c
DBI : Diazepam binding inhibitor
DEC : Dossier d'essai clinique
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DME : Dossier de médicament expérimental
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPA-713 : N,N-diethyl-2-(4-methoxyphenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide
DPA-714 : N,N-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide
EDC : Épisode dépressif chronique
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EOS : End of synthesis = rendement calculé de la décroissance



EPPI : Eau pour préparation injectable
FDG : Fluorodésoxyglucose
GABA : Acide gamma-amino-butyrique
GBq : GigaBecquerel
GDNF : Glial cell line neurotrophic factor
H⁺ : Proton
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
IBP : Isoquinoline-binding protein
IFN-γ : Interféron gamma
IL-6 : Interleukine 6
IP₃ : Inositol triphosphate
IRM : Imagerie par résonance magnétique
IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
kDa : Kilodalton
K_i : Constante d'inhibition
MA : Maladie d'Alzheimer
MBq : MégaBecquerel
Mg²⁺ : Ion magnésium
MMSE : Mini Mental State Examination
MPTP : Pore de transition de la perméabilité mitochondriale
MRP : Médicament radiopharmaceutique
MRPE : Médicament radiopharmaceutique expérimental
Na⁺ : Ion sodium
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
O₂ : Dioxygène
ODN : Octadecaneuropeptide
PAP-7 : PBR associated protein 7
PBR : Peripheral-type benzodiazepine receptor
pH : Potentiel hydrogène
P_i : Phosphate inorganique
PiB : Pittsburgh compound B
PRAX-1 : PBR associated protein1
PRC : Pureté radiochimique
PRN : Pureté radionucléidique



RIPH : Recherche impliquant la personne humaine
ROS : Radicaux oxygénés
SE : Substitution électrophile
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SN : Substitution nucléophile
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SPE : Solid phase extraction
SUV : Standardized uptake value
TEP : Tomographie par émission de positon
THF : Tétrahydrofurane
TNF- α : Tumor necrosis factor α
Tosyl-DPA : N,N-diethyl-2-(2-(4-(2-toluene-sulfonyloxyethoxy)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide
TSPO : Protéine de translocation
TTN : Triakontetranuropeptide
UV : Ultra-violet
VDAC : Canal anionique voltage-dépendant



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

Introduction.....	23
I. La protéine de translocation.....	24
I.1. Rappels historiques.....	24
I.1.1. Argumentaire du changement de dénomination.....	24
I.1.2. Du PBR à la protéine de translocation.....	24
I.2. Génomique, structure, organisation et distribution.....	24
I.2.1. Gène.....	24
I.2.2. Structure du monomère.....	25
I.2.3. Distribution.....	25
I.2.4. Polymorphisme.....	26
I.2.4.1 TSPO2.....	26
I.2.4.2 Polymorphisme <i>rs6971</i>	26
I.3. TSPO et activités mitochondriales.....	26
I.3.1. Translocation du cholestérol et stéroïdogénèse.....	26
I.3.1.1 Translocation du cholestérol.....	26
I.3.1.2 Stéroïdogénèse.....	27
I.3.2. TSPO, respiration cellulaire et synthèse d'ATP.....	27
I.3.2.1 Physiologie de la respiration cellulaire.....	27
I.3.2.2 Influence du TSPO sur la respiration mitochondriale.....	28
I.3.3. TSPO et pore de transition de la perméabilité mitochondriale.....	29
I.3.3.1 Fonctions physiologiques du MPTP.....	29
I.3.3.2 Structure du MPTP.....	29
I.3.3.3 MPTP et apoptose.....	31
I.3.3.4 Influence du TSPO sur l'ouverture du MPTP et son impact sur l'apoptose.....	31
I.3.4. Homéostasie calcique et mitochondries.....	32
I.3.4.1 Physiologie.....	32
I.3.4.2 TSPO et métabolisme calcique cellulaire.....	33
I.3.5. TSPO et espèces oxygénées réactives.....	33
I.3.5.1 TSPO et voies antioxydantes.....	34
I.3.5.2 TSPO et génération de ROS.....	34
I.4. Les ligands du TSPO.....	34
I.4.1. Les ligands endogènes.....	34
I.4.1.1 Le cholestérol.....	34
I.4.1.2 Les endozépinines.....	34
I.4.1.3 Les porphyrines.....	35
I.4.2. Les ligands de synthèse.....	35
I.4.2.1 Traceurs du TSPO.....	36
I.4.2.2 Exemple du [¹⁸ F]DPA-714.....	36
I.4.2.2.1. Pharmacologie du [¹⁸ F]DPA-714.....	36
I.4.2.2.1.1. Pharmacodynamie.....	36
I.4.2.2.1.2. Pharmacocinétique.....	36
I.4.2.2.1.2.1. Absorption.....	36
I.4.2.2.1.2.2. Distribution.....	37
I.4.2.2.1.2.2.1. Périphérique.....	37
I.4.2.2.1.2.2.2. Centrale.....	38



I.4.2.2.1.2.3. Métabolisme	38
I.4.2.2.1.2.4. Élimination	39
I.4.2.2.2. Dosimétrie du [¹⁸ F]DPA-714.....	39
I.4.2.3 Exemples de ligands et leurs effets pharmacologiques	39
I.4.2.3.1. Etifoxine.....	39
I.4.2.3.2. Emapunil.....	40
I.4.2.3.3. Alpidem.....	40
I.4.2.3.4. Olesoxime.....	40
I.4.2.3.5. PK-11195 et Ro5-4864	41
I.5. TSPO dans les pathologies neurologiques et psychiatriques	41
I.5.1. Expression du TSPO	41
I.5.1.1 Système nerveux périphérique	41
I.5.1.2 Système nerveux central.....	41
I.5.2. Pathologies neuronales	41
I.5.2.1 Maladie d'Alzheimer	41
I.5.2.2 Maladie de Parkinson.....	42
I.5.2.3 Accident vasculaire cérébral.....	42
I.5.3. Pathologies psychiatriques	42
I.5.4. Intérêt de cibler le TSPO.....	43
II. Synthèse d'un médicament radiopharmaceutique fluoré.....	45
II.1. La tomographie par émission de positon	45
II.1.1. Émetteur de positon.....	45
II.1.2. Détection en tomographie par émission de positon.....	48
II.1.2.1 La mesure des projections de l'objet	48
II.1.2.2 La reconstruction tomographique	48
II.1.2.3 Quantification	49
II.2. Production de médicaments radio pharmaceutiques fluorés.....	51
II.2.1. Production du fluor 18.....	51
II.2.1.1 Principe de fonctionnement du cyclotron	52
II.2.1.2 Production de l'ion source	52
II.2.1.3 Accélération de l'ion source.....	53
II.2.1.4 Champ électrique	54
II.2.1.5 Champ magnétique	54
II.2.1.6 Le vide	54
II.2.1.7 Du faisceau d'hydrures au faisceau de protons	54
II.2.1.8 Bombardement de la cible.....	55
II.2.2. Synthèse d'un radio-traceur.....	55
II.2.2.1 Module de synthèse	55
II.2.2.2 Les voies de synthèse.....	56
II.2.2.2.1. Fluoruration nucléophile.....	56
II.2.2.2.2. Fluoruration électrophile.....	58
II.2.2.3 Purification	58
II.2.2.3.1. Purification sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction).....	59
II.2.2.3.1.1. Pré-purification	59
II.2.2.3.1.2. Post-purification.....	59
II.2.2.3.2. Purification HPLC	59
II.2.2.4 Mise en forme pharmaceutique	60
II.2.2.5 Contrôles qualité du produit fini	61



II.2.2.5.1. Contrôles qualité en routine	61
II.2.2.5.2. Contrôles qualité différés	62
II.2.2.6 Réglementation des médicaments expérimentaux	63
II.2.2.6.1. Médicament expérimental : définition ANSM.....	63
II.2.2.6.2. Essai clinique : définition ANSM.....	63
II.2.2.6.3. Contexte réglementaire de la synthèse d'un MRPE	64
II.2.2.6.4. Les acteurs de la recherche.....	64
II.2.2.6.5. Mise en place d'un essai clinique.....	65
II.2.2.6.6. Les documents à fournir pour l'autorisation.....	65
III. Synthèse du [¹⁸ F]DPA-714 : retour d'expérience.....	67
III.1. Revue de la littérature	67
III.1.1. Synthèse du DPA-714	67
III.1.2. Synthèse du [¹⁸ F]DPA-714.....	68
III.2. Mise en place et optimisation de la production de [¹⁸ F]DPA-714 sur la plateforme de fluoration	70
III.2.1. Contrôles qualité par HPLC analytique	70
III.2.1.1 Mise en place de la méthode.....	70
III.2.1.1.1. Temps de rétention	70
III.2.1.1.2. Limite de quantification	72
III.2.1.2 Application et interprétation des résultats	73
III.2.2. Essais de synthèse du [¹⁸ F]DPA-714	74
III.2.2.1 Premier lot de précurseur tosylé : synthèses de septembre 2015 à juillet 2016	74
III.2.2.2 Deuxième lot de précurseur tosylé : synthèses de novembre 2016 à janvier 2017.....	75
III.2.3. Procédé choisi pour la synthèse du [¹⁸ F]DPA-714 au CHU de Toulouse.....	75
III.2.3.1 L'automate de fluoration Synchrom R&D ®	75
III.2.3.2 Le précurseur	77
III.2.3.3 Production du [¹⁸ F]Fluor	77
III.2.3.4 La préparation du [¹⁸ F]Fluor.....	77
III.2.3.5 La substitution nucléophile	78
III.2.3.6 Pré-purification	78
III.2.3.7 Purification du [¹⁸ F]DPA-714.....	78
III.2.3.8 Post-purification et concentration	78
III.2.4. Description des synthèses nécessaires à l'élaboration du DME 1.....	78
III.2.4.1 Lot n°1.....	79
III.2.4.2 Lot n°2.....	80
III.2.4.3 Lot n°3.....	81
III.3. Discussion.....	82
III.3.1. Rendements	82
III.3.2. Activités spécifiques	83
III.3.3. Purification sur HPLC Semi-Préparative	84
III.3.4. Utilisation du [¹⁸ F]DPA-714 dans la RIPH	84
III.3.4.1 NICAD.....	84
III.3.4.2 VIP	85
III.3.4.3 Coma3D.....	86
III.3.4.4 InflaDep.....	86



Conclusion.....	87
Références bibliographiques	88
Annexes	94
Serment de Galien.....	103



Table des illustrations

Figure 1 : Structure du TSPO dans la membrane mitochondriale, avec les acides aminés impliqués dans la fixation des ligands Ro5-4864, PK-11195, alpidem.	25
Figure 2 : Séquence CRAC humaine comparée aux espèces murines et sa représentation moléculaire associée au cholestérol (Midzak et al. 2011)	27
Figure 3 : Schéma de la respiration mitochondriale	28
Figure 4: Schéma de la respiration mitochondriale en présence de ligands du TSPO	29
Figure 5 : Schéma du MPTP (Gatliff et Campanella 2012).....	30
Figure 6 : Schéma du MPTP (Casellas, Galiegue, et Basile 2002)	31
Figure 7 : Rôle de la mitochondrie dans les flux calciques cellulaires	33
Figure 8 : Classes, noms et structures des principaux ligands du TSPO (Rupprecht et al. 2010)	35
Figure 9 : Fixation au niveau périphérique du [18F]DPA-714 chez la souris à 30 et 60 min (Vicidomini et al. 2015)	37
Figure 10 : Cinétiques des activités de [18F]DPA-714 par organe (Vicidomini et al. 2015).....	37
Figure 11 : Cinétique de captation cérébrale du [18F]DPA-714 chez le babouin <i>P.hamadryas</i> (James et al. 2008).....	38
Figure 12 : Principaux métabolites du [18F]DPA-714 et leurs poids moléculaires (Peyronneau et al. 2013)	38
Figure 13 : Classes, noms et structures de ligands du TSPO avec activité pharmacologique.	39
Figure 14 : Schéma de désintégration d'un émetteur β^+	45
Figure 15 : Schéma de désintégration du ^{18}F	46
Figure 16 : Annihilation du positon avec émission de 2 photons de 511 KeV.....	46
Figure 17 : Schéma d'une couronne de détection TEP (Aurengo, s. d.).....	48
Figure 18 : Etapes de fabrication du sinogramme (Nalis 2009).....	49
Figure 19 : Comparaison du mode 2D (gauche) et du mode 3D (droite) (Nalis 2009).....	49
Figure 20 : Etapes avant l'obtention du SUV (de Dreuille et al. 2004).....	50
Figure 21 : Cyclotron IBA - CHU Toulouse	51
Figure 22 : Principe de création de l'ion source	52
Figure 23 : Cheminées d'extraction de l'ion source.....	53
Figure 24 : Structure simplifiée du cyclotron	53
Figure 25 : Trajectoire des ions hydrures sous l'impulsion des champs électriques et magnétiques.....	54
Figure 26 : Production du proton via le stripper.....	55
Figure 27 : Automate de synthèse Synchrom R&D®	56



Figure 28 : Synthèse du [¹⁸ F]DPA-714 en une étape (Damont et al. 2008).....	57
Figure 29 : Synthèse du [¹⁸ F]FDPN en deux étapes (Schultz et al. 2013).....	57
Figure 30 : Synthèse par substitution électrophile de la [¹⁸ F]FluoroDOPA (Le Bars 2005).....	58
Figure 31 : Chromatogramme de synthèse du [¹⁸ F]DPA-714 en double détection (UV et gamma) en sortie de colonne	60
Figure 32 : Structure, formule et poids moléculaire du DPA-714.....	67
Figure 33 : Structure du DPA-713.....	67
Figure 34 : Synthèse du DPA-714 (Damont et al. 2008).....	67
Figure 35 : Synthèse du DPA-714 (James et al. 2008).....	68
Figure 36 : Synthèse du tosyl-DPA-714 et du [¹⁸ F]DPA-714 (Damont et al. 2008).....	68
Figure 37 : Synthèse du précurseur tosylé et du [¹⁸ F]DPA-714 (James et al. 2008).....	69
Figure 38 : Synthèse du précurseur tosylé et du [¹⁸ F]DPA-714 (Doorduyn et al. 2009).....	69
Figure 39 : superposition des chromatogrammes de [¹⁹ F]DPA-714 après injection de 0,1 µg ; 0,2 µg ; 0,5 µg ; 0,75 µg et 1 µg sur colonne analytique.....	71
Figure 40 : Chromatogramme du tosylDPA-714 sur colonne HPLC analytique.....	71
Figure 41 : Coefficient de variation de l'aire sous la courbe en fonction de la quantité de [¹⁹ F]DPA-714	72
Figure 42 : Coefficient de variation de l'aire sous la courbe en fonction de la quantité de tosyl-DPA.....	72
Figure 43 : Chromatogramme de co-injection du [¹⁹ F]DPA-714 et du tosyl-DPA.....	73
Figure 44 : Chromatogramme HPLC - Détecteur gamma	73
Figure 45 : Chromatogrammes gamma et UV de co-injection du [¹⁸ F]DPA-714 et du [¹⁹ F]DPA-714	74
Figure 46 : Schéma de montage de l'automate pour la synthèse du [¹⁸ F]DPA-714.....	76
Figure 47 : Structure du (N,N-diethyl-2-(2-(4-(2-toluenesulfonyloxyethoxy)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide).....	77
Figure 48 : Procédé de synthèse du [¹⁸ F]DPA-714 au CHU de Toulouse	78
Figure 49 : Cinétique des biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer (Jack et Holtzman 2013).....	85

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux émetteurs de positons utilisés à des fins médicales (Disselhorst et al. 2010; Paans 1997; Walther et al. 2011; Z. Li et Conti 2010).....	47
Tableau 2 : Avantages et inconvénients du marquage au ^{18}F	51
Tableau 3 : Récapitulatif des CQ sur le produit fini (« Pharmacopée européenne 9e Edition EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament » 2017).....	63
Tableau 4 : Récapitulatif des synthèses de [^{18}F]DPA-714 dans la littérature.....	69
Tableau 5 : Conditions d'HPLC analytique.....	70
Tableau 6 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°1 de [^{18}F]DPA-714.....	79
Tableau 7 : Résultats de la synthèse du lot n°1.....	79
Tableau 8 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°2 de [^{18}F]DPA-714.....	80
Tableau 9 : Résultats de la synthèse du lot n°2.....	80
Tableau 10 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°3 de [^{18}F]DPA-714.....	81
Tableau 11 : Résultats de la synthèse du lot n°3.....	81
Tableau 12 : Récapitulatif des synthèses du [^{18}F]DPA-714.....	83
Tableau 13 : Récapitulatif des purifications.....	84



Introduction

La neuro-inflammation se caractérise par l'activation des cellules gliales, notamment la microglie, associée à la libération accrue de facteurs pro-inflammatoires au niveau cérébral. Ces cellules microgliales participent activement à la réponse immunitaire au niveau du système nerveux central.

Ce phénomène inflammatoire est fréquemment associé aux pathologies neuronales telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux, ... ou encore des maladies psychiatriques comme l'épisode dépressif chronique. Cependant les effets de la neuro-inflammation sur ces pathologies demeurent ambigus voire contradictoires.

Cartographier et quantifier la neuro-inflammation constituent donc un enjeu majeur, et sont possibles grâce à l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP).

La microglie activée présente une surexpression de la protéine de translocation, le TSPO, qui sera la cible du radiotracer TEP faisant l'objet de cette thèse : le [¹⁸F]DPA-714.

Le but de cette thèse a été la mise en place de synthèses automatisées permettant l'obtention de ce médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE) fluoré présentant une haute affinité pour le TSPO répondant aux exigences pharmaceutiques.

Dans un premier temps, cette mise en place a pour but la fabrication des lots nécessaires à la réalisation du dossier de médicament expérimental (DME) qui sera transmis à l'ANSM, l'organisme national compétent pour valider l'utilisation du MRPE chez l'Homme.

Dans un second temps, ces synthèses automatisées permettront de produire de manière régulière et répétable le [¹⁸F]DPA-714, qui sera utilisé dans divers protocoles de recherche impliquant la personne humaine.



I. La protéine de translocation

I.1. Rappels historiques

Le récepteur aux benzodiazépines de type périphérique (PBR : "peripheral-type benzodiazepine receptor") est une protéine transmembranaire ubiquitaire située principalement dans la membrane externe mitochondriale. Il a été découvert en 1977 lorsque des scientifiques cherchaient les sites de fixation du diazepam dans les tissus périphériques, ce qui a amené à l'appellation PBR pour le distinguer du récepteur central, la sous-unité α du complexe GABA_A. D'autres noms lui ont été donnés : récepteur mitochondrial des benzodiazépines, IBP ("isoquinoline-binding protein"), pk18 ou encore récepteur ω 3, mais aucun n'était évocateur de ses fonctions cellulaires, ce qui a motivé la recherche d'une nouvelle appellation.

I.1.1. Argumentaire du changement de dénomination

Le terme "benzodiazépine" est inapproprié car d'autres ligands tels que le cholestérol ou les porphyrines ont la capacité de se lier au PBR. De plus, toutes les benzodiazépines ne se fixent pas sur la protéine.

Le terme "type périphérique" ne reflète pas la distribution tissulaire réelle de la protéine car elle est également exprimée dans la microglie et les astrocytes, localisés dans le système nerveux central (SNC).

Le PBR n'est pas un récepteur au sens traditionnel. Bien que sa localisation soit majoritairement mitochondriale, il a également été retrouvé au niveau nucléaire, et à ce jour, aucune donnée ne permet de mettre en évidence des fonctions communes entre la fraction nucléaire et la fraction mitochondriale.

I.1.2. Du PBR à la protéine de translocation

En 2006, le groupe de travail, mené par Vassilios Papadopoulos, a proposé comme nouvelle dénomination : la protéine de translocation (18 kDa), ou "translocator protein", abrégée TSPO. Le TSPO fait référence à l'unité fonctionnelle de 18 kDa liant tous les ligands connus du PBR. Cette appellation a été choisie du fait de sa localisation mitochondriale transmembranaire et de sa fonction principale de transport (Papadopoulos et al. 2006). L'abréviation TSPO vient de la molécule de TspO (tryptophan-rich sensory transducer of oxygen) retrouvée dans certaines bactéries, qui s'avère être homologue au PBR des mammifères, et qui exerce les mêmes fonctions physiologiques que ce dernier (Yeliseev et Kaplan 2000).

I.2. Génomique, structure, organisation et distribution

I.2.1. Gène

Le gène codant le TSPO humain se situe sur le chromosome 22q13.2. Il est constitué de quatre exons et code pour 169 acides aminés. Un variant du gène nommé PBR-S, ne contient pas l'exon 2 du fait de l'épissage alternatif et présente un cadre de lecture ouvert différent du TSPO. L'ARN messager (ARN_m) du PBR-S est dix fois plus abondant que celui du TSPO, mais à ce jour aucune preuve expérimentale n'a pu mettre en évidence l'existence d'une protéine PBR-S. Le TSPO est une protéine qui a été très conservée au cours de l'évolution.



La séquence d'ADN codant pour la protéine a été clonée à partir de plusieurs espèces murines, bovines et humaines, et présente 80% d'homologie au sein de ces différentes espèces. Par conséquent cette homologie est retrouvée sur la séquence protéique du TSPO au sein de ces espèces (cf. Annexe 1).

I.2.2. Structure du monomère

Le TSPO est une protéine de la membrane externe mitochondriale, constituée de 169 acides aminés (18 kDa) agencés en cinq domaines transmembranaires structurés en hélice α formant une poche hydrophobe. (Papadopoulos et al. 2006)

L'extrémité N-terminale du TSPO est intra-mitochondriale, tandis que l'extrémité C-terminale est cytosolique. L'extrémité C-ter est impliquée dans la captation du cholestérol via la séquence CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus). Grâce aux acides aminés qui la constituent, cette dernière est fortement chargée.

Les cinq domaines transmembranaires du TSPO sont reliés par deux boucles extra-mitochondriales et deux intra-mitochondriales. Les boucles 1 et 3 se projettent dans le cytosol tandis que les 2 et 4 se projettent dans la mitochondrie.

Les cinq hélices α transmembranaires forment un canal d'environ 3 à 4 Å permettant le transport du cholestérol au sein de la mitochondrie.

Bien que le TSPO soit un monomère fonctionnel, il a la capacité de se polymériser suite à la fixation de certains ligands ou en réponse à certains stimuli tels les radicaux oxygénés.

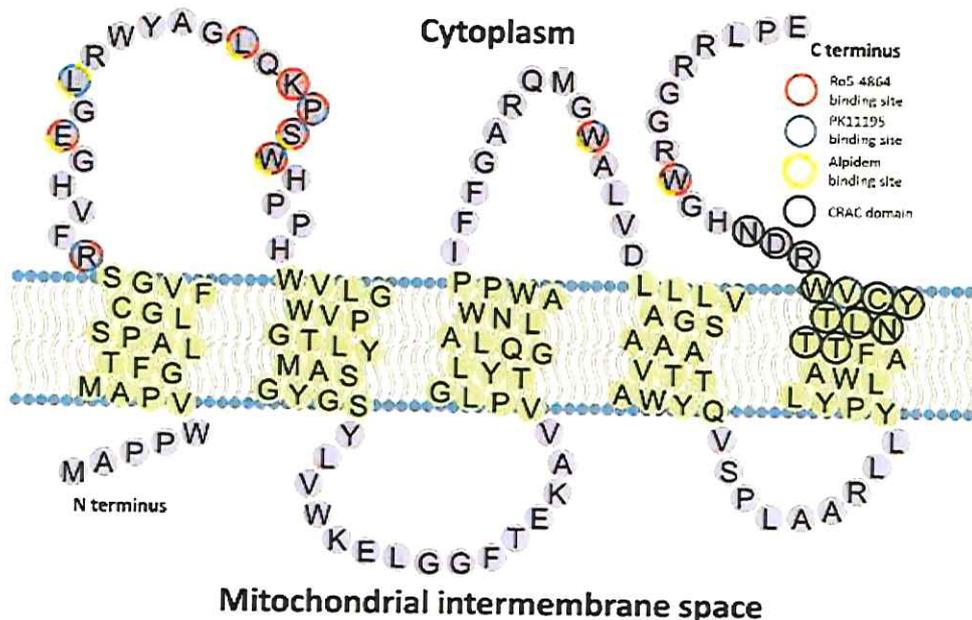


Figure 1 : Structure du TSPO dans la membrane mitochondriale, avec les acides aminés impliqués dans la fixation des ligands Ro5-4864, PK-11195, alpidem.

I.2.3. Distribution

Le TSPO est une protéine ubiquitaire, codée par l'ADN nucléaire, et présente particulièrement dans les cellules des tissus synthétisant les stéroïdes, tels que les surrénales, les gonades et le système nerveux central (SNC), notamment dans les astrocytes et la microglie. Cette

protéine a été conservée au cours de l'évolution et est indispensable au développement tissulaire. En effet chez la souris, l'inactivation du TSPO induit une mort embryonnaire précoce (Papadopoulos et al. 2006)

Le TSPO est un composant crucial d'un complexe multimérique de 140 à 240 kDa, localisé dans la membrane externe mitochondriale et particulièrement au niveau des zones de contact entre les deux membranes mitochondriales.

Ce complexe est constitué :

- Du TSPO, de poids moléculaire de 18 kDa
- Du canal anionique voltage-dépendant (VDAC) de poids moléculaire 32 kDa
- Du transporteur de l'adénine nucléotidique (ANT) de poids moléculaire 30 kDa
- La protéine cytosolique PRAX-1 "PBR associated protein1" (240 kDa) qui interagit avec le TSPO et module l'activité de ce dernier (Galiègue et al. 1999)
- La protéine PAP7 "PBR associated protein 7" (52 kDa) impliquée dans la cascade de signalisation aboutissant à la stéroïdogénèse (H. Li et al. 2001).

I.2.4. Polymorphisme

I.2.4.1 TSPO2

Le TSPO2 est une protéine paralogue du TSPO. Celui-ci est exprimé principalement dans le tissu hématopoïétique et est impliqué dans la redistribution du cholestérol lors de la maturation des érythrocytes (Fan, Rone, et Papadopoulos 2009). Contrairement au TSPO, le TSPO2 est situé au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. Il n'a pas la capacité de lier les ligands du TSPO hormis le cholestérol.

I.2.4.2 Polymorphisme *rs6971*

Le polymorphisme *rs6971* sur l'exon 4 du gène du TSPO, est à l'origine d'une substitution non-conservatrice de l'alanine par la thréonine (147^{ème} acide aminé) qui modifie l'affinité des ligands pour le TSPO. Dans la population européenne, la forme alanine a une prévalence de 70% et présente une haute affinité de liaison, a contrario de la forme thréonine qui présente une faible affinité et dont la prévalence est de 30%. Au final la prévalence des 3 phénotypes possibles est de : 49% pour les homozygotes « forte affinité », 9% pour les homozygotes « faible affinité » et 42% pour les hétérozygotes « affinité intermédiaire » (Kreisl et al. 2013). Ces différences d'affinité au sein de la population sont à prendre en compte lors de l'interprétation d'examen par tomographie par émission de positons (TEP) ciblant le TSPO.

I.3. TSPO et activités mitochondriales

I.3.1. Translocation du cholestérol et stéroïdogénèse

I.3.1.1 Translocation du cholestérol

Dans les cellules synthétisant les hormones stéroïdiennes, le TSPO régule la translocation du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne mitochondriale, qui est l'étape limitante de la synthèse. Une corrélation positive a été démontrée entre le niveau d'expression du TSPO et la stéroïdogénèse (Rupprecht et al. 2010). Le cholestérol est capté par le TSPO au niveau de son extrémité C-terminale cytosolique via le domaine CRAC. Cette séquence CRAC est constituée d'une dizaine d'acides aminés, les principaux responsables de



l'interaction étant : la Thréonine 148, la Leucine 150, l'Asparagine 151, la Lysine 152 et l'Arginine 156. Cette extrémité C-ter du TSPO joue un rôle majeur dans l'absorption du cholestérol à partir d'un donneur cytosolique vers la membrane interne mitochondriale.

<i>H. sapiens</i>	T	T	L	N	Y	C	V	W	R	D
<i>M. musculus</i>	T	V	L	N	Y	Y	V	W	R	D
<i>R. norvegicus</i>	T	M	L	N	Y	Y	V	W	R	D

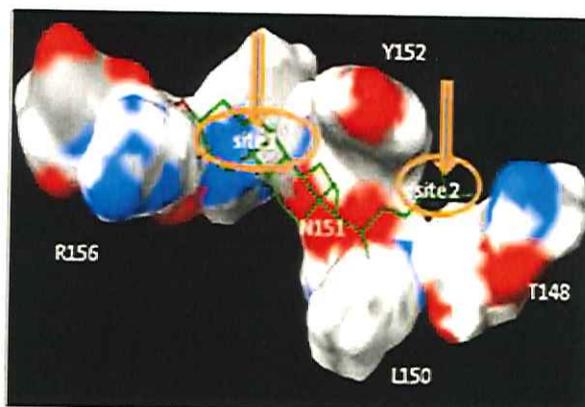


Figure 2 : Séquence CRAC humaine comparée aux espèces murines et sa représentation moléculaire associée au cholestérol (Midzak et al. 2011)

I.3.1.2 Stéroïdogénèse

Au niveau de la membrane interne mitochondriale, le cholestérol sera métabolisé par le cytochrome P450_{scc} (side-chain-cleaving) (CYP11A1) en pregnenolone. Cette molécule constitue le précurseur de nombreuses hormones stéroïdiennes (selon les tissus : androgènes, œstrogènes, progestérone, corticostéroïdes, neurostéroïdes) qui sera métabolisé au niveau du réticulum endoplasmique.

Les neurostéroïdes exercent un effet modulateur sur quasiment tous les types de transmissions synaptiques. Selon leur nature, ils peuvent aussi bien stimuler qu'inhiber l'excitation neuronale. La synthèse des neurostéroïdes est propre à la région cérébrale ainsi qu'au type de neurone, et dépend de l'abondance du TSPO mais également de la machinerie enzymatique située en aval du récepteur.

Certains neurostéroïdes issus de la pregnenolone, tels l'allopregnanolone et l'allotetrahydrodeoxycorticosterone, sont des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A synaptique et extra-synaptique et dont le site de fixation sur le récepteur est différent de celui des benzodiazépines. L'effet des neurostéroïdes sur le récepteur GABA_A dépend des sous-unités qui le constituent.

I.3.2. TSPO, respiration cellulaire et synthèse d'ATP

I.3.2.1 Physiologie de la respiration cellulaire

Dans les cellules de mammifères deux mécanismes permettent de fournir de l'adénosine triphosphate (ATP) à la cellule : la phosphorylation oxydative (dans les mitochondries) et la

glycolyse (dans le cytosol). L'activité mitochondriale est fortement dépendante du gradient électrochimique des protons H^+ de part et d'autre la membrane interne. Ce gradient est à l'origine d'une différence de pH et d'une différence de potentiel qui constituent les principaux moteurs de la phosphorylation oxydative. Cette dernière se constitue de la chaîne respiratoire et de l'ATP-synthase localisées dans la membrane interne mitochondriale. La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes : la NADH-deshydrogénase (I), la succinate-deshydrogénase (II), la cytochrome C-réductase (III) et la cytochrome C-oxydase (IV). Au cours du passage des électrons dans la chaîne respiratoire, des protons sont pompés de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire contre le gradient de concentration. L'ATP-synthase utilise ensuite le gradient de protons créé par la chaîne respiratoire pour synthétiser l'ATP à partir d'une adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique (P_i). La synthèse de l'ATP est dépendante de la chaîne respiratoire mais également la disponibilité des substrats. Pour cela, il existe deux transports bidirectionnels permettant à l'ADP d'entrer dans la mitochondrie et à l'ATP d'en sortir : le VDAC au niveau de la membrane externe mitochondriale et l'ANT au niveau de la membrane interne. L'activité du VDAC est modulée par des ligands endogènes comme la tubuline qui induit une inhibition réversible du transporteur à l'origine d'une diminution de la respiration (Gatliff et Campanella 2012).

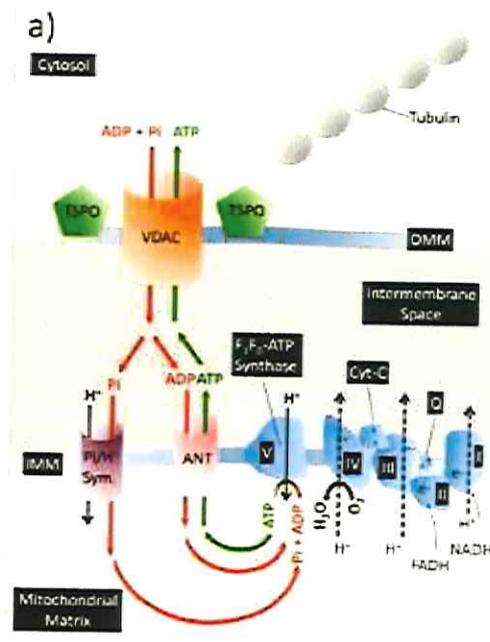


Figure 3 : Schéma de la respiration mitochondriale

I.3.2.2 Influence du TSPO sur la respiration mitochondriale

Le TSPO, de par sa proximité avec le VDAC, a été suspecté de moduler le métabolisme énergétique de la cellule. Dans des cellules murines de neuroblastome, deux ligands du TSPO, le Ro5-4864 et le PK-11195, diminuent de manière dose-dépendante la consommation d' O_2 , révélatrice d'une diminution de la synthèse d'ATP (Larcher et al. 1989). Ces mêmes ligands diminuent la vitesse enzymatique du complexe III (ADP-dépendante) et augmentent celle du complexe IV, aboutissant à une diminution de la synthèse d'ATP (Hirsch et al. 1989). Cependant le ratio ATP/ADP est inchangé démontrant que la phosphorylation de l'ADP par

l'ATP-synthase n'est pas affectée par les ligands du TSPO. Le TSPO influencerait sur la respiration et la synthèse d'ATP en interagissant avec le VDAC et en diminuant sa perméabilité aux substrats de l'ATP.

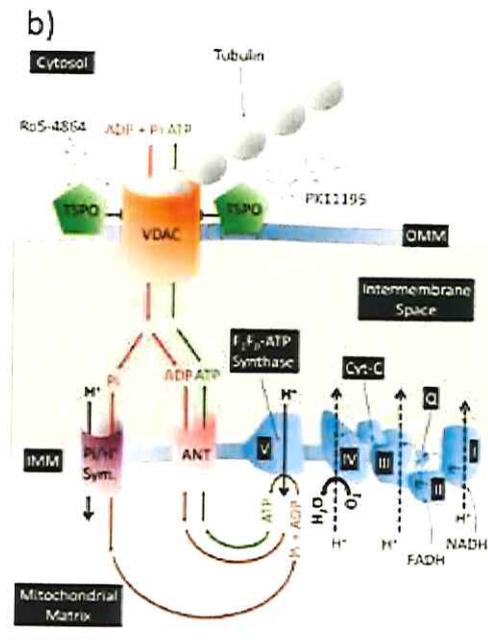


Figure 4: Schéma de la respiration mitochondriale en présence de ligands du TSPO

I.3.3. TSPO et pore de transition de la perméabilité mitochondriale

Le pore de transition de la perméabilité mitochondriale (MPTP) est un complexe multi-protéique situé aux sites de contact entre les membranes mitochondriales (interne et externe), ces sites représentant des zones d'échanges métaboliques entre le cytosol, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

I.3.3.1 Fonctions physiologiques du MPTP

Le MPTP influe sur la concentration calcique $[Ca^{2+}]$ matricielle, le pH, le gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) et le volume mitochondrial, en jouant le rôle de canal non sélectif. Le canal ouvert possède un diamètre de 2.0 à 2.6 nm permettant de laisser passer des solutés de poids moléculaires conséquents, jusqu'à 1.5 kDa. Le MPTP permet la création du gradient électrochimique nécessaire à la respiration mitochondriale. L'ouverture du MPTP est étroitement régulée par le gradient électrochimique et le pH matriciel et peut être inhibée spécifiquement par la ciclosporine A, l'EDTA et le magnésium Mg^{2+} .

I.3.3.2 Structure du MPTP

Six protéines montrent une implication dans la formation du pore ou dans sa régulation :

- L'hexokinase, localisée dans le cytosol, responsable de la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate.
- Le VDAC, protéine mitochondriale abondante représentant 20% des protéines de la membrane externe. Il est d'ordinaire ouvert et constitue la voie principale de diffusion

des métabolites (<1 kDa) à travers la membrane externe. (Casellas, Galiegue, et Basile 2002)

- La créatine kinase, dans l'espace inter-membranaire permettant la production et le transfert vers le cytosol de la phosphocréatine.
- L'ANT, est l'antiport ADP/ATP localisé dans la membrane interne.
- La cyclophiline D (20 kDa), de localisation matricielle qui interagit avec l'ANT. La cyclophiline D est une protéine ayant une activité peptidyl-prolyl isomérase permettant le changement de conformation de la forme *cis* à la forme *trans* des peptides, en agissant au niveau de séquences protéiques riches en proline.
- Le TSPO

Du fait de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale, le VDAC/ANC constitue un canal essentiel au transfert des solutés à partir de la matrice. L'ouverture du canal du côté de la membrane interne survient en deux étapes : d'abord la liaison de la cyclophiline D à l'ANT, puis l'activation par l'ion Ca^{2+} de la cyclophiline D aboutissant au changement de conformation de l'ANT.

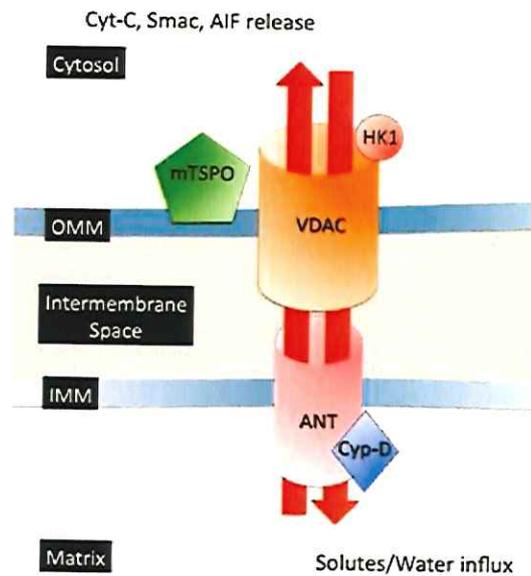


Figure 5 : Schéma du MPTP (Gatliff et Campanella 2012)

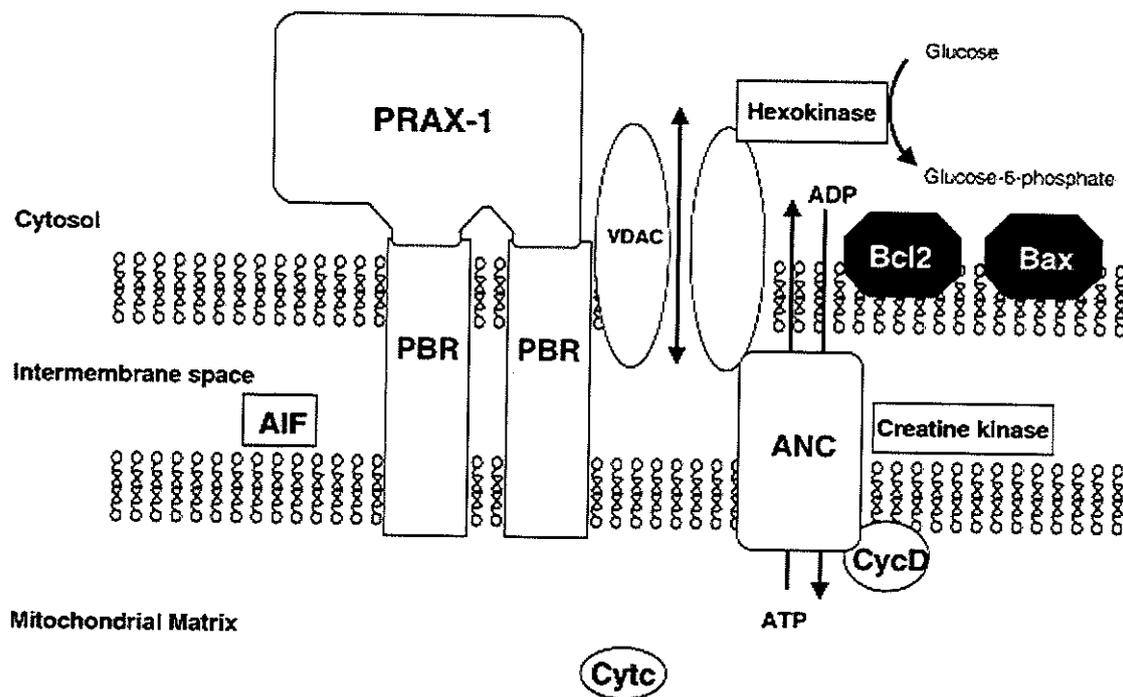


Figure 6 : Schéma du MPTP (Casellas, Galiegue, et Basile 2002)

I.3.3.3 MPTP et apoptose

En plus des fonctions citées ci-dessus, le MPTP est également impliqué dans les processus de dommages et de mort cellulaire, en réponse à des situations telles que le stress oxydatif ou l'exposition à des cytokines pro-apoptotiques. L'ouverture du MPTP induit la dissipation du gradient électrochimique, le découplage mitochondrial puis une dilution de la matrice et une hypertrophie mitochondriale. Ceci s'accompagne d'une altération de la membrane externe mitochondriale à l'origine d'une libération dans le cytosol de protéines inter-membranaires, parmi lesquelles le Cyt-C « cytochrome c » et l'AIF "apoptosis inducing factor". Une fois libéré dans le cytosol, l'AIF migre dans le noyau où il induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Quant au Cyt-C, celui-ci se complexe avec l'Apaf-1 "apoptosis activating factor 1" et la pro-caspase 9, induisant une cascade protéolytique aboutissant à l'activation de la caspase 3. Cette dernière permet l'activation d'enzymes induisant des modifications structurelles caractéristiques de l'apoptose, touchant le noyau, le cytosquelette et de la membrane plasmique. L'élément indispensable déclencheur de l'ouverture du MPTP est la concentration élevée en Ca^{2+} , mais nécessite cependant une sensibilisation du MPTP. Parmi ces facteurs sensibilisants on peut trouver : des concentrations faibles en ADP et ATP, une concentration élevée en phosphate, un stress oxydatif ou encore des protéines de la famille Bcl-2. Au sein de cette famille de protéines, certaines exercent un effet inducteur ou inhibiteur de l'apoptose via leur proximité avec le MPTP au niveau de la membrane externe (Marzo et al. 1998).

I.3.3.4 Influence du TSPO sur l'ouverture du MPTP et son impact sur l'apoptose

Le mécanisme de régulation du MPTP par le TSPO n'est pas clairement établi. Cependant, des ligands du TSPO tels que le Ro 5-4864 ou la protoporphyrine IX ont démontré stimuler la

formation Ca^{2+} -dépendante du MPTP tandis qu'un anticorps anti-TSPO exerçait l'effet inverse. Le TSPO a également démontré son implication dans la libération de facteurs pro-apoptotiques, via la génération de radicaux oxygénés, aboutissant au relargage du Cyt-C dans le cytosol et à l'activation du VDAC (Veenman, Papadopoulos, et Gavish 2007). Une expérience in vitro sur les cellules de Jurkat a montré que le TSPO potentialisait l'effet du $\text{TNF}\alpha$ dans les voies de l'apoptose, tandis que sur les cellules leucémiques U937, selon les ligands en présence du TSPO, l'effet pro-apoptotique du $\text{TNF}\alpha$ était soit potentialisé, soit diminué. Tout ceci amène à penser que le TSPO joue un rôle évident dans la régulation du MPTP et de l'apoptose.

I.3.4. Homéostasie calcique et mitochondries

I.3.4.1 Physiologie

Les mitochondries possèdent la capacité d'accumuler les ions calcium Ca^{2+} au sein de leur matrice et jouent un rôle dans l'homéostasie calcique cellulaire. Les mouvements du Ca^{2+} dans les mitochondries dépendent de la coopération de trois phénomènes, fluctuant selon le niveau énergétique de la mitochondrie :

- La consommation du Ca^{2+} ; à partir du cytosol via le transporteur calcique MCU "mitochondrial Ca^{2+} uniport" dépendant du gradient électrochimique calcique, c'est-à-dire de la différence de potentiel et du gradient de concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ entre le cytosol et la matrice.
- Les phénomènes d'efflux ; se faisant via le transporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (antiport) qui est lui-même couplé au transporteur Na^+/H^+ , dépendant du gradient électrochimique H^+ .
- La formation de complexes calciques insolubles dans la matrice ; dépendant strictement du pH matriciel.

Dans les conditions physiologiques, les mitochondries ont la capacité d'accumuler rapidement le Ca^{2+} , sous réserve d'une proximité (≈ 100 nm) avec le récepteur à l'inositol-triphosphate (IP_3) du réticulum endoplasmique. La présence de récepteurs à l' IP_3 et de transporteurs SERCA « sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase » contribue à la création de micro domaines intracellulaires de concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ élevée. Le VDAC, au niveau mitochondrial, facilite l'accumulation du Ca^{2+} et ce, de manière proportionnelle à l'expression du transporteur. À l'interface réticulum endoplasmique/mitochondrie, le VDAC forme un complexe macromoléculaire avec le récepteur à l' IP_3 et la protéine chaperone Grp-75. Le VDAC interagirait avec le récepteur à l' IP_3 via la protéine Grp-75.



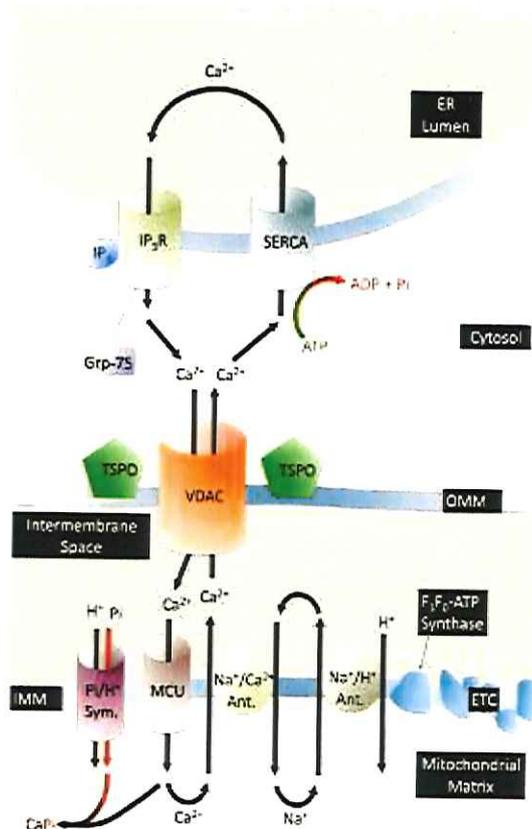


Figure 7 : Rôle de la mitochondrie dans les flux calciques cellulaires

I.3.4.2 TSPO et métabolisme calcique cellulaire

Certains ligands du TSPO tels que le PK-11195 et le Ro 5-4864 sont capables d'induire de manière dose-dépendante une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire, indépendamment de la concentration calcique extracellulaire. L'utilisation concomitante d'un inhibiteur du MPTP (la ciclosporine A) et d'un agoniste partiel du TSPO (le flunitrazepam) a montré que ce flux d'ions Ca^{2+} était indépendant du MPTP mais était influencé par le TSPO (Ostuni et al. 2007). Dans les cellules cardiaques de rat, l'hémine a démontré limiter la consommation de Ca^{2+} par les mitochondries de manière dose-dépendante (Tamse et al. 2008)

I.3.5. TSPO et espèces oxygénées réactives

Les espèces oxygénées réactives (ROS "reactive oxygen species") regroupent les molécules et radicaux libres dérivés du dioxygène O_2 , et dont le principal représentant est l'anion superoxyde O_2^- . Dans la cellule, plusieurs sources de ROS existent. Dans le cytosol les ROS peuvent être générés par les NADPH-oxydases et la xanthine-oxydase, cependant la source principale de ROS au niveau cellulaire est la mitochondrie, via l'activité de la chaîne respiratoire. Physiologiquement les ROS sont impliqués dans de multiples cascades de signalisation régulant les fonctions cellulaires. Cependant un excès de production de ROS, aboutissant à un stress oxydatif, peut être délétère pour la cellule dès lors que les fonctions anti-oxydantes sont dépassées, pouvant entraîner une oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

I.3.5.1 TSPO et voies antioxydantes

Les cellules de Jurkat transfectées avec l'ADN humain du TSPO ont montré une résistance au peroxyde d'hydrogène H₂O₂ supérieure aux cellules naïves de TSPO. Ces mêmes cellules transfectées ont démontré une résistance supérieure aux rayonnements ionisants par rapport aux cellules naïves (Carayon et al. 1996).

I.3.5.2 TSPO et génération de ROS

A contrario, dans certaines circonstances physiologiques, le TSPO semble être impliqué dans la génération des ROS. En effet, dans des cellules humaines de glioblastome, l'extinction du gène du TSPO ou l'utilisation du PK-11195, un antagoniste du récepteur, diminuent la production mitochondriale de ROS (Veenman, Shandalov, et Gavish 2008).

Les ROS ont la capacité d'induire la polymérisation du TSPO (Delavoie et al. 2003).

I.4. Les ligands du TSPO

I.4.1. Les ligands endogènes

I.4.1.1 Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols, de structure tétracyclique et constitués de 27 atomes de carbones. C'est une molécule à la fois d'origine exogène (alimentation) et principalement endogène (synthèse par l'HMG-CoA réductase).

Il est le précurseur de nombreuses molécules dans l'organisme telles que les hormones stéroïdiennes ou les acides biliaires et joue un rôle structural dans les membranes cellulaires. Le cholestérol se fixe sur le TSPO au niveau de la séquence CRAC à l'extrémité C-terminale de la protéine.

I.4.1.2 Les endozépines

Les endozépines sont une famille de neuropeptides, initialement isolées à partir du cerveau de rat, qui ont la capacité de déplacer les benzodiazépines de leur site de fixation sur les récepteurs GABA_A. A contrario du cholestérol, qui se fixe sur le TSPO au niveau de l'extrémité C-ter via la séquence CRAC, les autres ligands du récepteur se fixent au niveau de la partie N-terminale. Les endozépines sont obtenues à partir du clivage d'un précurseur polypeptidique : le diazepam-binding inhibitor (DBI). Le DBI est codé par un gène largement exprimé dans le système nerveux. Les principaux fragments peptidiques biologiquement actifs sont l'octadecaneuropeptide DBI33-50 (ODN) et le triakontatetranuropeptide DBI17-50 (TTN), qui stimulent la synthèse stéroïdienne mitochondriale.

Dans le système nerveux périphérique (SNP), les endozépines sont synthétisées par les cellules de Schwann. En réponse à une lésion neuronale, la synthèse est accrue de manière concomitante à la surexpression du TSPO.

Dans le système nerveux central (SNC), le gène du DBI est principalement exprimé dans les cellules gliales. La synthèse des endozépines par les astrocytes est augmentée en présence du peptide β -amyloïde, qui joue un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA). Des taux élevés d'endozépines sont également retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien des malades atteints de MA.



Le TSPO est donc impliqué dans la réponse gliale, via les sécrétions autocrines et paracrines des endozépinines, lors de maladies neurodégénératives ou de lésions neuronales.

1.4.1.3 Les porphyrines

Les porphyrines sont des molécules cycliques impliquées dans le transport de l'oxygène, mais également dans l'activité de certaines enzymes, telle la guanylate-cyclase ou la glutathion-transférase.

Les porphyrines, auxquelles l'hème et la protoporphyrine IX appartiennent, présentent une affinité élevée pour le TSPO ($K_i \approx 20$ à 50 nM) (Verma et Snyder 1988) et ont la capacité de déplacer de manière compétitive des ligands de synthèse du TSPO, tel le [3H]PK-11195 (dérivé isoquinoline carboxamide). Cette fixation sur le TSPO suggère que ce dernier est impliqué dans les voies de synthèse de l'hème. (Taketani et al. 1994)

Les porphyrines ont la capacité de moduler les flux calciques mitochondriaux, en l'occurrence de les diminuer via leur fixation sur le TSPO (Tamse et al. 2008).

1.4.2. Les ligands de synthèse

Les ligands de synthèse historiques du TSPO sont le PK-11195 et le Ro5-4864 (7-chloro- 5-(4-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-méthyl-2H-1,4-benzodiazépin-2-one). Le PK-11195 est un ligand strict du TSPO, tandis que le Ro5-4864, qui est une benzodiazépine, nécessite d'autres protéines mitochondriales en plus du TSPO pour se fixer de façon optimale. Ces ligands ont été largement utilisés dans l'identification et la caractérisation de la protéine.

Le PK-11195 est considéré comme un ligand précurseur ayant servi de base à la synthèse de nouveaux ligands du TSPO.

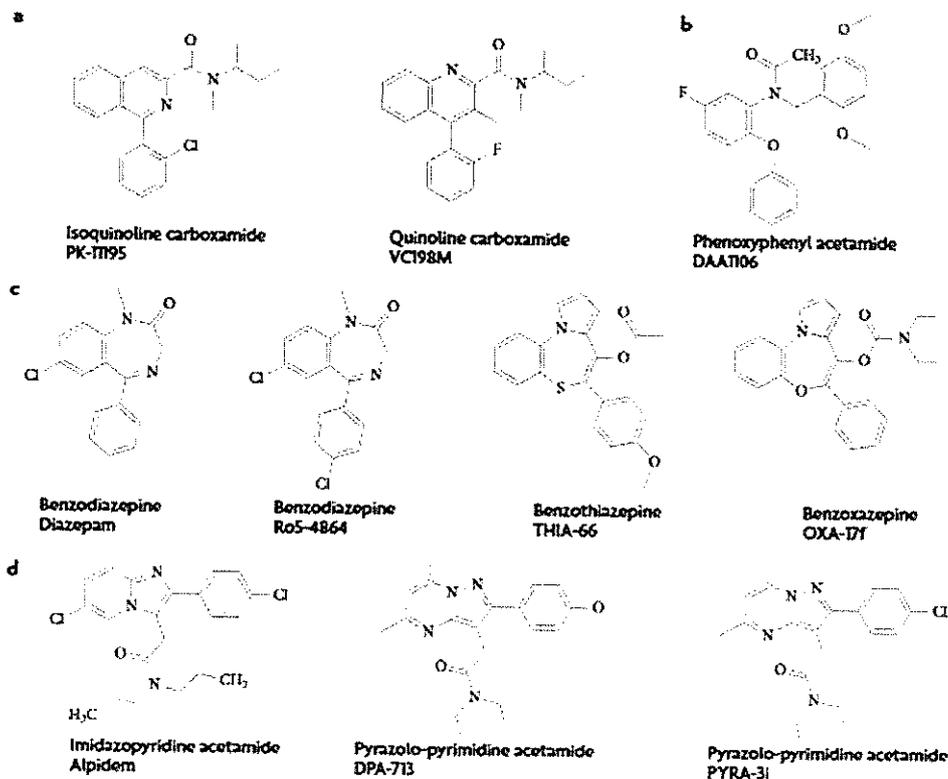


Figure 8 : Classes, noms et structures des principaux ligands du TSPO (Rupprecht et al. 2010)

I.4.2.1 Traceurs du TSPO

La plupart de ces ligands ont été développés pour l'imagerie TEP neuronale, comme marqueurs de la neuro-inflammation dans diverses pathologies.

Le PK-11195 et le Ro5-4864 se lient au TSPO de manière sélective avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Le dérivé phenoxyphényle acetamide DAA1106 est un ligand d'intérêt dans l'imagerie ciblant le TSPO de par son affinité (subnanomolaire) et sa sélectivité pour ce dernier.

Les dérivés benzodiazépines, comme le diazepam, ciblent de manière non-sélective le récepteur au GABA_A et le TSPO, tandis que les dérivés benzothiazépines et benzoxazépines sont sélectifs du TSPO.

D'autres classes de ligands tels les imidazopyridine acetamides et les pyrazolo-pyrimidine acetamides (DPA-713, DPA-714) sont utilisés *in vivo* pour l'imagerie ciblant le TSPO.

Cependant certains des ligands de synthèse ont montré des effets pharmacologiques que nous allons détailler dans les items suivants.

I.4.2.2 Exemple du [¹⁸F]DPA-714

Le [¹⁸F]DPA-714 étant le sujet principal de ce travail, nous allons aborder plus en détail ce ligand dans les items ci-dessous.

I.4.2.2.1. Pharmacologie du [¹⁸F]DPA-714

I.4.2.2.1.1. Pharmacodynamie

Le [¹⁸F]DPA-714 présente une affinité élevée pour le TSPO avec une constante d'inhibition (K_i) de 7.0 ± 0.4 nM (James et al. 2008) tandis qu'il présente une affinité beaucoup moindre pour le récepteur central aux benzodiazépines ($K_i > 10000$ nM) faisant de lui un traceur spécifique du TSPO.

Quelques interactions médicamenteuses ont été relatées dans la littérature :

- Lors d'une exposition aux morphiniques : le volume de distribution du [¹⁸F]DPA-714 était augmenté de 30% chez les patients présentant une forte affinité de liaison (Auvity et al. 2017).
- Les anesthésiques tels que l'isofurane et le propofol ont démontré diminuer la liaison du [¹⁸F]DPA-714 sur ses sites de fixation (Saba et al. 2015).

I.4.2.2.1.2. Pharmacocinétique

I.4.2.2.1.2.1. Absorption

Le [¹⁸F]DPA-714 étant administré par voie intraveineuse (IV), il n'est donc pas soumis au phénomène d'absorption.



I.4.2.2.1.2.2. Distribution

I.4.2.2.1.2.2.1. Périphérique

Dans le modèle murin, les organes fixant le plus le [¹⁸F]DPA-714 sont les poumons, le cœur et les reins, puis fixant moyennement la rate et le foie, et enfin faiblement le cerveau.

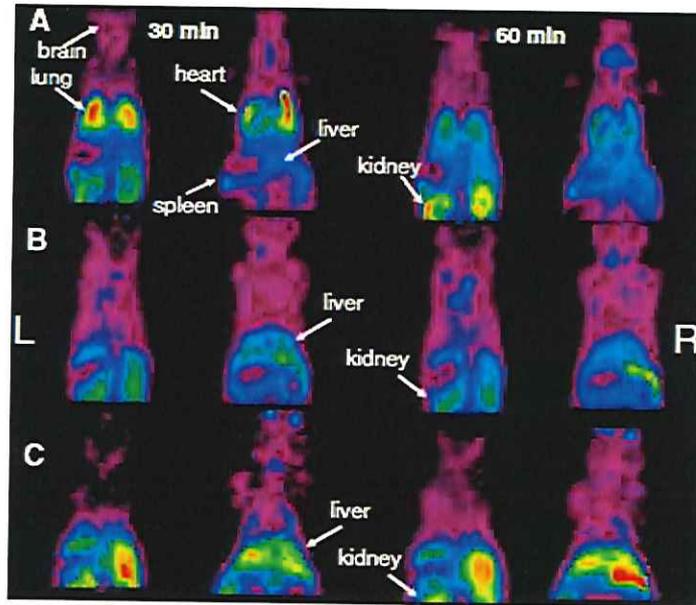


Figure 9 : Fixation au niveau périphérique du [¹⁸F]DPA-714 chez la souris à 30 et 60 min (Vicidomini et al. 2015)

De la même manière la fixation du traceur ne suit pas la même cinétique d'un organe à un autre.

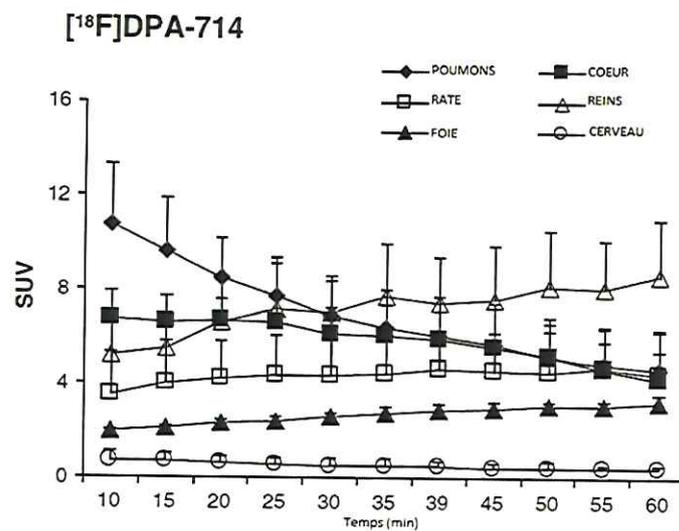


Figure 10 : Cinétiques des activités de [¹⁸F]DPA-714 par organe (Vicidomini et al. 2015)

I.4.2.2.1.2.2. Centrale

Bien que la fixation du [^{18}F]DPA-714 soit faible au niveau central, elle est néanmoins rapide avec un maximum d'accumulation atteint 10 min après injection, et est relativement stable durant l'heure suivante (James et al. 2008).

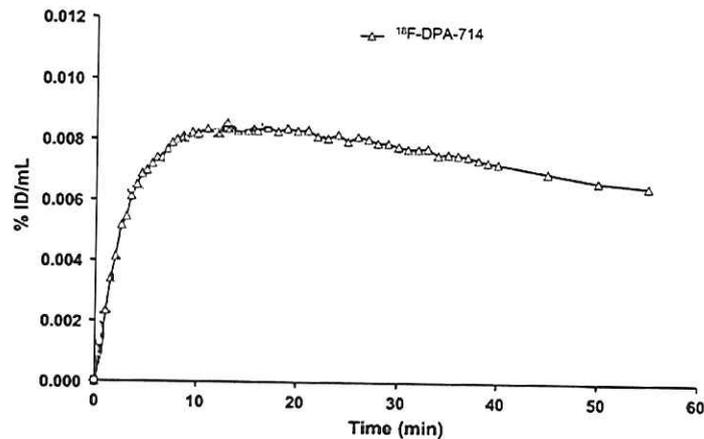


Figure 11 : Cinétique de captation cérébrale du [^{18}F]DPA-714 chez le babouin *P.hamadryas* (James et al. 2008)

I.4.2.2.1.2.3. Métabolisme

Le [^{18}F]DPA-714 est stable dans le plasma à 37°C pendant 180 min dans le modèle animal. Environ 20% du [^{18}F]DPA-714 subit un métabolisme hépatique oxydatif par les cytochromes P450, principalement par l'isoforme CYP3A4 et dans une proportion beaucoup plus faible par le CYP2D6. Sous l'action des cytochromes le [^{18}F]DPA-714 subit, par fréquence d'apparition, des phénomènes d'hydroxylation, de N-déethylation et de O-déethylation, aboutissant à la formation de trois principaux métabolites (cf. figure ci-dessous) (Peyronneau et al. 2013).

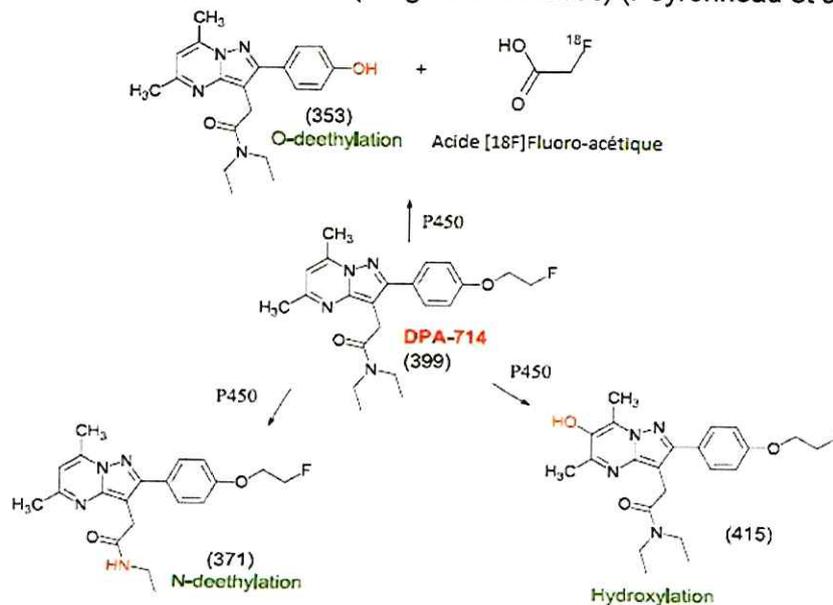


Figure 12 : Principaux métabolites du [^{18}F]DPA-714 et leurs poids moléculaires (Peyronneau et al. 2013)



I.4.2.2.1.2.4. Élimination

Le [¹⁸F]DPA-714 inchangé est éliminé principalement par voie hépatobiliaire tandis que les radiométabolites hydrophiles sont éliminés par voie urinaire (Peyronneau et al. 2013).

I.4.2.2.2. Dosimétrie du [¹⁸F]DPA-714

La dosimétrie pour l'Homme a été extrapolée à partir d'études pré-cliniques. La dose efficace « corps entier » a été estimée à 26 µSv/MBq, très proche de la valeur d'un examen TEP au [¹⁸F]FDG (environ 24 µSv/MBq) (« Dossier de médicament expérimental : données cliniques (DME 3) » 2016) (Annexe 2).

I.4.2.3 Exemples de ligands et leurs effets pharmacologiques

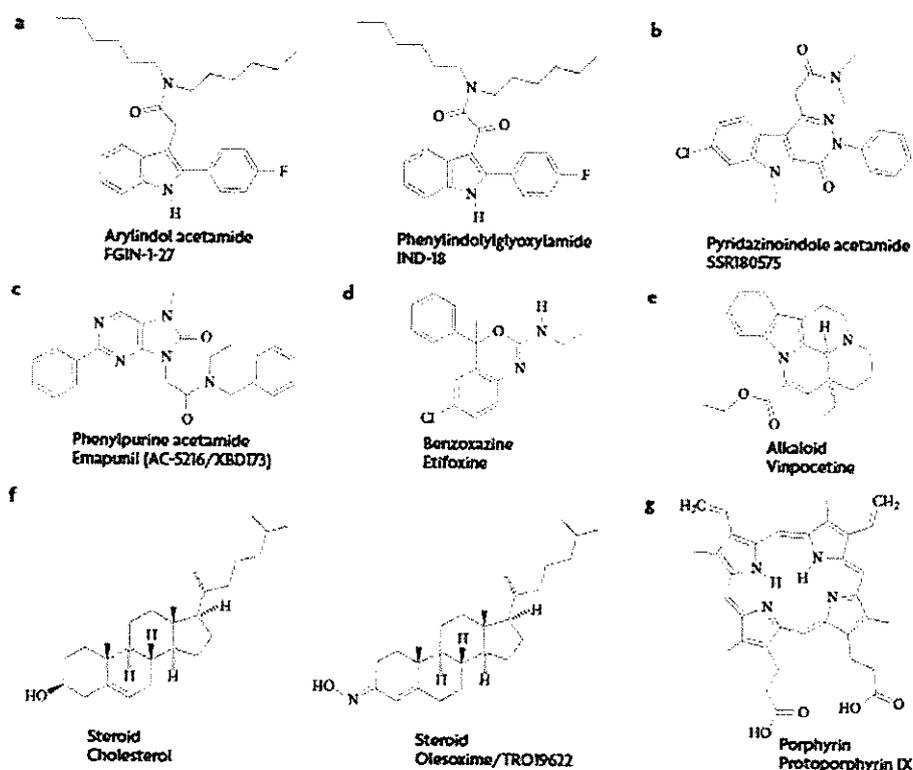


Figure 13 : Classes, noms et structures de ligands du TSPO avec activité pharmacologique

I.4.2.3.1. Etifoxine

L'etifoxine présente une forte affinité pour le TSPO mais lie également le récepteur GABA_A. Cette capacité à lier les deux récepteurs serait à l'origine de ses effets anxiolytiques. Au niveau moléculaire, la fixation sur le TSPO stimule la synthèse de neurostéroïdes. Dans le modèle in vitro mimant des lésions nerveuses périphériques, l'etifoxine a permis via la fixation sur le TSPO, une accélération de la régénération axonale et une meilleure récupération fonctionnelle. De plus il a été observé en présence d'etifoxine, une diminution de l'activation macrophagique et de la production de cytokines (Girard et al. 2008).

I.4.2.3.2. Emapunil

L'emapunil potentialise la neurotransmission GABAergique en stimulant la stéroïdogénèse et exerce un effet anxiolytique similaire aux benzodiazépines sans les effets indésirables de types sédation et accoutumance (Rupprecht et al. 2009).

Suite à cela, une étude clinique de phase II avait été menée par Novartis pour évaluer l'efficacité, la sécurité et la tolérance de l'emapunil dans les troubles de l'anxiété généralisée. Cette étude n'a jamais été publiée, l'emapunil ne démontrant aucune efficacité dans la diminution de l'anxiété par rapport au groupe placebo.

I.4.2.3.3. Alpidem

L'alpidem est un ligand du TSPO et se fixant également sur le récepteur GABA_A. Il a été approuvé dans l'indication d'anxiété en France en 1991 et retiré du marché en 1994 après mise en évidence de toxicités hépatiques.

I.4.2.3.4. Olesoxime

L'olesoxime se lie au TSPO au niveau du site de fixation du cholestérol, mais son mécanisme d'action précis n'a pas été établi.

Au niveau du système nerveux périphérique, l'olesoxime améliore la régénération neuronale et diminue les douleurs neuropathiques aussi bien d'origine diabétique qu'induites par les chimiothérapies (T. Bordet et al. 2008).

Dans le modèle in vitro simulant le système nerveux central, l'olesoxime augmente la survie des motoneurones. De plus, dans le modèle murin atteint de sclérose latérale amyotrophique (SLA), cette molécule a permis d'augmenter la survie des motoneurones et de diminuer les symptômes cliniques de la maladie (Thierry Bordet et al. 2007).

Des études cliniques de phase II et III ont été menées sur l'ajout de l'olesoxime au riluzole dans le traitement de la SLA. Malgré sa très bonne tolérance, l'olesoxime n'a pas démontré de bénéfices significatifs sur la survie à 18 mois.

Cependant, l'olesoxime a montré un bénéfice clinique significatif dans l'amyotrophie musculaire spinale (AMS). En effet la molécule a permis sur 2 ans de préserver la fonction motrice des patients ayant reçu le principe actif par rapport aux patients ayant reçu le placebo (Dessaud et al. 2014).

En 2015, le comité des médicaments pédiatriques de l'agence européenne des médicaments a donné un avis favorable pour un plan d'investigation pédiatrique quant à l'utilisation de l'olesoxime dans l'AMS.

Actuellement, l'olesoxime est disponible dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATUn) : OLESOXIME 100 mg/ml, poudre pour suspension buvable, commercialisé par le laboratoire Roche.



I.4.2.3.5. PK-11195 et Ro5-4864

Bien qu'utilisés initialement pour caractériser le TSPO, ces deux molécules exercent des effets pharmacologiques similaires ayant les conséquences suivantes : la croissance des neurites, neuroprotection, amélioration de la survie neuronale, réduction de la microglie activée en absence de neurodégénération...

I.5. TSPO dans les pathologies neurologiques et psychiatriques

I.5.1. Expression du TSPO

I.5.1.1 Système nerveux périphérique

En réponse à une lésion, le TSPO est fortement surexprimé dans le SNP notamment dans les macrophages, les cellules de Schwann (responsable de la myélinisation des axones périphériques) et les neurones. Dans le SNP, les ligands du TSPO favorisent la régénération axonale et modulent la neuro-inflammation par la synthèse de facteurs de croissance et de neuro-stéroïdes.

I.5.1.2 Système nerveux central

Dans le SNC le niveau d'expression du TSPO est bas chez l'Homme sain.

Cependant en cas de lésions neuronales, par exemple lors d'un accident vasculaire cérébral, le TSPO est surexprimé dans la microglie activée, les macrophages et les astrocytes, avec cependant un profil spatio-temporel différent pour ces derniers (Maeda et al. 2007).

Chez les patients atteints de la MA (positifs au marqueur amyloïde ^{11}C -Pib-PET) et présentant une affinité intermédiaire ou élevée pour le ^{18}F]-DPA-714, une surexpression du TSPO a également été observée (Hamelin et al. 2016). Dans cette même étude une corrélation positive a été démontrée entre la surexpression du TSPO et le score MMSE.

La microglie fournit la première protection en cas de maladies ou de lésions, en participant aux mécanismes de l'immunité innée et adaptative. Elle est impliquée dans la viabilité et à la régénération neuronale.

Cependant, l'activation chronique de la microglie peut être délétère pour les neurones et jouer un rôle majeur dans les processus neuro-dégénératifs. La surexpression du TSPO est directement liée au degré de sévérité des lésions.

I.5.2. Pathologies neuronales

I.5.2.1 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est due à la formation de plaques amyloïdes constituées de protéine A β . L'activation de la microglie apparaît au stade prodromal et possiblement au stade pré-clinique et semble jouer un rôle protecteur dans la progression clinique de la maladie à ces stades précoces. Une corrélation positive a été démontrée entre la surexpression du TSPO et le score MMSE. De plus la surexpression du TSPO ralentirait la dégradation de l'état clinique (Hamelin et al. 2016).

L'effet bénéfique de l'activation microgliale serait dû à l'activité de phagocytose de la plaque amyloïde qui diminuerait ainsi la charge amyloïde (Hanisch et Kettenmann 2007).



Cependant cette activité de phagocytose est diminuée par les cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère que la microglie activée dans un contexte inflammatoire exerce un effet protecteur moindre.

L'administration d'anti-inflammatoire chez la souris atteinte de MA, a permis la suppression de la réponse inflammatoire par la microglie et d'atténuer ainsi les symptômes de la maladie (Hanisch et Kettenmann 2007).

Au CHU de Toulouse, deux protocoles de recherche impliquant la personne humaine vont être menés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces deux essais auront pour objectif d'évaluer l'activation microgliale et la neuro-inflammation par imagerie TEP, en utilisant un traceur fluoré spécifique du TSPO : le [¹⁸F]DPA-714.

Ces deux protocoles sont :

- VIP : protocole thérapeutique évaluant l'efficacité d'un nouvel anti-inflammatoire, le VX-745 ou neflamapimod versus placebo, chez les patients à un stade précoce de MA.
- NICAD : protocole non-thérapeutique ayant pour objectif d'évaluer la neuro-inflammation chez les patients atteints de MA.

I.5.2.2 Maladie de Parkinson

Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, ont été retrouvés des taux plasmatiques élevés d'interféron gamma (IFN- γ). Suite à ces observations des études de mort neuronale induite par le MPTP au niveau de la substance noire ont été menées sur le modèle murin. L'expérience a démontré que les souris déficientes en IFN- γ présentaient une activation microgliale réduite ainsi qu'une perte moindre des neurones dopaminergiques. Des études *in vitro* ont démontré que la destruction des neurones dopaminergiques induite par une toxine, nécessitait la présence de la microglie.

Ces expériences ont permis de démontrer que l'activation microgliale pouvait exercer un effet délétère dans la maladie de Parkinson (Hanisch et Kettenmann 2007).

I.5.2.3 Accident vasculaire cérébral

Après une lésion ischémique cérébrale, les cellules microgliales s'accumulent au niveau du site de la lésion et de sa région adjacente, la pénombre. L'accumulation de la microglie au niveau de la lésion est corrélée à une diminution des dommages neuronaux et une augmentation de la survie neuronale, tandis qu'en cas de déplétion de la population microgliale, la taille de l'infarctus est majorée.

L'injection des cellules microgliales exogènes chez la gerbille de Mongolie a montré une augmentation du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) et du facteur neurotrophique dérivé des lignées de cellules gliales (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor), qui expliqueraient l'effet bénéfique de la microglie sur la survie neuronale (Hanisch et Kettenmann 2007).

I.5.3. Pathologies psychiatriques

Les neurostéroïdes, sont des puissants modulateurs de l'anxiété et de la dépression. Une diminution de l'expression du TSPO sur les plaquettes, mais également de la synthèse d'ARN_m dans les lymphocytes a été mise en évidence chez les patients anxieux, bipolaires ou encore schizophréniques. Cependant, la dépression seule n'a pas été associée à une



diminution de l'expression du TSPO dans les plaquettes (Weizman et al. 1995). Les patients dépressifs ou présentant des troubles anxieux présentent plus fréquemment le polymorphisme Ala147Thr, correspondant au remplacement de l'alanine par la thréonine au niveau du 147^{ème} acide aminé, et qui affecterait la synthèse de la pregnenolone (Costa, Pini, Martini, et al. 2009; Costa, Pini, Gabelloni, et al. 2009).

Au niveau central, l'épisode dépressif caractérisé (EDC) et l'EDC résistant ont été associés à une microgliose habituellement peu exprimée dans le cerveau humain. Cette infiltration de la microglie entraîne une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) aboutissant à un état inflammatoire. Les cytokines exercent au cours de cette réponse immunitaire une action sur la régulation des neurotransmetteurs mono-aminergiques, particulièrement sur la sérotonine. En effet il existe une réponse inflammatoire activant l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) qui dégrade le tryptophane en kynurenine. Or le tryptophane étant un précurseur de la sérotonine, l'inflammation pourrait entraîner une diminution des taux du neurotransmetteur. Au CHU de Toulouse, un protocole d'essai clinique, InflaDep va être mis en place, dans le but d'évaluer et de comparer l'état neuro-inflammatoire des patients souffrant d'EDC résistant modéré à sévère par rapport à un groupe contrôle (patients non-déprimés).

1.5.4. Intérêt de cibler le TSPO

En imagerie, cibler le TSPO, permet ainsi d'évaluer des lésions cérébrales de physiopathologies différentes ainsi que leur progression. La surexpression du TSPO ne survenant pas seulement en cas de lésions mais également dans le processus de régénération, les mécanismes de réparation peuvent être ainsi évalués (Rupprecht et al. 2009).

La surexpression du TSPO a également été mise en évidence dans de multiples maladies neuro-dégénératives, particulièrement au niveau des sites de pertes neuronales. Ceci a été démontré pour la maladie d'Alzheimer, les démences fronto-temporales, la sclérose en plaques, la maladie d'Huntington, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson.

Une étude sur le modèle murin atteint de la maladie d'Alzheimer montrait que l'expression du TSPO dans la microglie était associée à une perte neuronale, tandis que dans les astrocytes elle s'accompagnait d'une diminution des lésions neuronales (Ji et al. 2008).

Une autre étude, chez des animaux atteints de maladies démyélinisante, suivies ensuite d'un processus de remyélinisation, révélait des taux élevés de TSPO pendant la régénération de la myéline. Ces expériences suggèrent que le TSPO joue un rôle dans les processus de réparation neuronale. (Chen et al. 2004; Agnello et al. 2000).

Dans l'EDC et dans l'EDC résistant, cibler le TSPO en imagerie TEP présente un intérêt majeur. En effet il a été démontré qu'une dysrégulation de la réponse immunitaire était souvent présente dans ces pathologies, aboutissant à un état inflammatoire ayant pour conséquence la dérégulation de la neurotransmission mono-aminergique (Setiawan et al. 2015).

Cibler la microglie via le TSPO chez les patients comateux, permettrait d'évaluer leur potentiel de récupération neurologique. Actuellement les données cliniques ne permettent pas de

distinguer, à la phase aigüe, les patients qui pourront récupérer de ceux qui évolueront vers un état chronique.

Le protocole Coma3D, utilisant le [^{18}F]DPA-714, va être mis en place au CHU de Toulouse pour évaluer les connexions cérébrales structurelles, fonctionnelles et métaboliques des patients dans le coma. Ces connexions cérébrales joueraient un rôle important dans les processus de récupération.



II. Synthèse d'un médicament radiopharmaceutique fluoré

II.1. La tomographie par émission de positon

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle d'émission non-invasive largement répandue dans le domaine de l'oncologie et de la neurologie, utilisée à des fins de diagnostics et de suivis thérapeutiques.

La réalisation d'un examen de TEP nécessite l'administration d'un médicament radio pharmaceutique (MRP). Celui-ci est constitué d'un vecteur moléculaire (substrat, ligand ou autre permettant de cibler une fonctionnalité ou une substance à étudier) et d'un isotope radioactif qui permet de localiser la distribution du vecteur au sein de l'organisme. L'intérêt des isotopes émetteurs de positons est double : ils peuvent facilement être incorporés aux molécules sans altérer leurs propriétés biologiques et permettent également de réaliser des reconstructions d'image en trois dimensions avec une très bonne sensibilité et résolution.

La réalisation d'un examen TEP correspond l'enchaînement de plusieurs opérations que nous allons aborder dans cette partie. Nous nous focaliserons dans un premier temps sur l'examen TEP lui-même comprenant la détection du rayonnement, la reconstruction tomographique et les corrections nécessaires pour fournir une image représentative de la distribution du MRP au sein du patient. Puis dans un second temps, nous nous intéresserons à la production de l'isotope, la synthèse du MRP, le contrôle qualité du médicament et l'injection du MRP au patient.

II.1.1. Émetteur de positon

Les émetteurs de positons sont des atomes caractérisés par un excès de charges positives dans leurs noyaux. Ils se désintègrent vers un état stable par transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un positon et d'un neutrino.



Le positon (pouvant être symbolisé par e^+ ou β^+) est de masse égale à celle d'un électron mais de charge opposée.

Pour qu'il y ait émission β^+ , l'énergie en excès de l'atome radioactif doit avoir une valeur minimale de 1.022 MeV. Cette valeur correspond à l'énergie libérée sous forme de deux photons γ de 511 keV lors l'annihilation de du positon avec un électron du milieu.

Les transferts d'énergie sont symbolisés sur la figure ci-dessous :

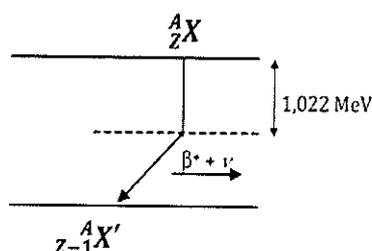


Figure 14 : Schéma de désintégration d'un émetteur β^+

L'atome X dont le nombre de masse (nombre de nucléons) est A et le nombre de protons est Z, se désintègre en transformant un proton en neutron, l'atome X devient Y (dont le nombre de protons est Z-1), et il y a émission d'un positon.



Ci-dessous l'exemple de l'isotope le plus utilisé en TEP : le 18-Fluor, ${}^{18}\text{F}$.

En se désintégrant, le ${}^{18}\text{F}$ émet un positon avec une énergie cinétique maximale de 633 keV.

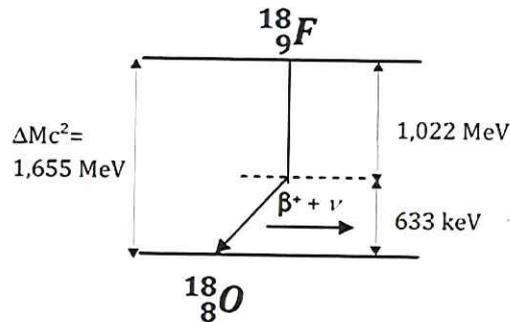


Figure 15 : Schéma de désintégration du ${}^{18}\text{F}$

Une fois émis, le positon parcourt quelques millimètres dans les tissus, au cours desquels il perd l'intégralité son énergie cinétique. Quand l'énergie cinétique du positon est nulle, c'est-à-dire lorsqu'il a terminé son parcours dans la matière, il interagit avec un électron libre du milieu, aboutissant au phénomène d'annihilation, au cours duquel les deux particules se transforment en deux photons gamma de 511 keV, émis à 180° dans des directions opposées (coïncidence).

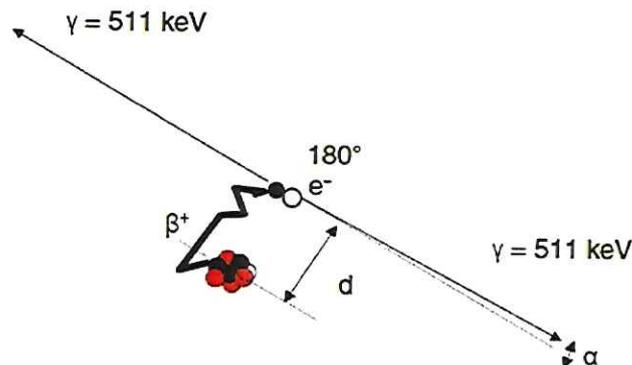


Figure 16 : Annihilation du positon avec émission de 2 photons de 511 KeV

Le principe de base de la TEP est de détecter ces deux photons de 511 keV pour déterminer le lieu de l'annihilation.

Les principaux émetteurs de positons utilisés en TEP ainsi que leurs caractéristiques sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Principaux émetteurs de positons utilisés à des fins médicales (Disselhorst et al. 2010; Paans 1997; Walther et al. 2011; Z. Li et Conti 2010)

Radionucléide	Période physique	Mode de décroissance (%)	E_{β^+max} (keV)	Parcours moyen du β^+ (mm) dans l'eau	Produit de décroissance	Méthode de production la plus courante	Chimie	Exemples d'application
Fluor 18 ^{18}F	110 min	β^+ (97) EC (3)	635	0,62	Oxygène 18 ^{18}O	$^{18}O(p,n)^{18}F$ (cyclotron)	Chimie organique	$[^{18}F]FDG$: analogue du glucose, traceur utilisé en oncologie
Carbone 11 ^{11}C	20,4 min	β^+ (99,8) EC (0,2)	960	1,1	Bore 11 ^{11}B	$^{14}N(d,n)^{11}C$ (cyclotron)	Chimie organique	$^{11}CH_3I$ utilisé pour le marquage de nombreuses molécules organiques comme le $[N\text{-methyl-}^{11}C]PIB$ marqueur des plaques amyloïdes
Azote 13 ^{13}N	9,96 min	β^+ (100)	1190	1,5	Carbone 13 ^{13}C	$^{16}O(p, ^4He)^{13}N$ (cyclotron)	Chimie organique	$^{13}NH_3$ utilisé pour marquer des acides aminés
Oxygène 15 ^{15}O	2,03 min	β^+ (99,9) EC (0,1)	1720	2,5	Azote 15 ^{15}N	$^{14}N(d,n)^{15}O$ (cyclotron)	Chimie en phase gazeuse rapide	$[^{15}O]H_2O$ utilisé pour visualiser le flux sanguin cérébral ou myocardique
Iode 124 ^{124}I	4,18 j	β^+ (25) EC (75)	2140	3,48	Tellure 64 ^{64}Te	$^{124}Te(p,n)^{124}I$ (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	β^+ (18) β^- (37) EC (45)	655	0,64	β^+ , CE : Nickel 64 ^{64}Ni β^- : Zinc 64 ^{64}Zn	$^{64}Ni(p,n)^{64}Cu$ (cyclotron)	Chimie de chélation	$^{64}Cu\text{-ATSM}$: traceur de l'hypoxie tumorale
Gallium 68 ^{68}Ga	68,3 min	β^+ (90) EC (10)	1900	3,48	Zinc 68 ^{68}Zn	$^{68}Ge\text{-}^{68}Ga$ (Générateur)	Chimie de chélation	Analogues de la somatostatine (DOTA-TOC, DOTA-TATE)
Zirconium 89 ^{89}Zr	3,3 j	β^+ (23) EC (77)	897	1	Yttrium 89 ^{89}Y	$^{89}Y(p,n)^{89}Zr$ (cyclotron)	Chimie de chélation	$^{89}Zr\text{-trastuzumab}$, anticorps ayant une affinité pour les récepteurs HER2

Le ^{11}C , le ^{13}N et le ^{15}O ayant une demi-vie très courte, ceci impose que la production des isotopes, la synthèse du MRP et son injection au patient se fassent sur le même site.

Concernant le ^{18}F , sa demi-vie plus longue, a permis la mise en place d'un réseau de distribution de MRP, les centres cliniques ne possédant pas de cyclotron peuvent aussi bénéficier de MRP fluorés. Le gallium 68 (^{68}Ga) est quant à lui disponible par le biais d'un générateur (Galliapharm®) dont le noyau père est le germanium 68 (^{68}Ge) et possède une période physique de 270,8 jours.



II.1.2. Détection en tomographie par émission de positon

L'obtention d'une image TEP s'effectue en deux étapes :

II.1.2.1 La mesure des projections de l'objet

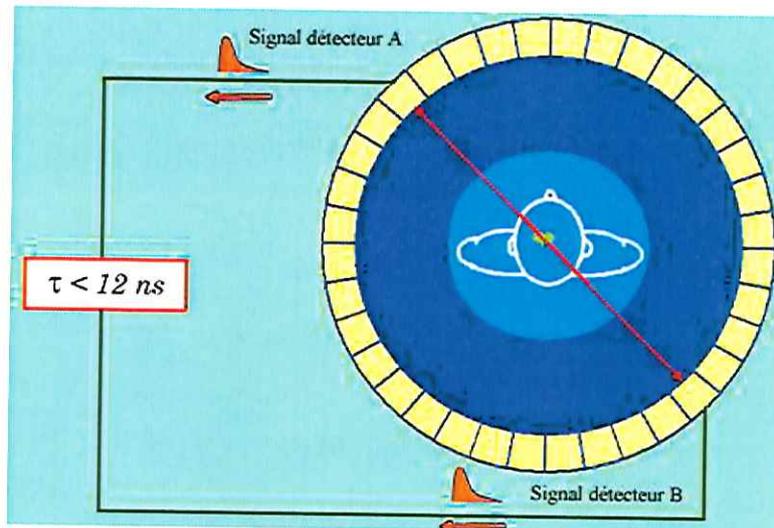


Figure 17 : Schéma d'une couronne de détection TEP (Aurengo, s. d.)

La mesure des projections de l'objet repose sur le principe de la détection en coïncidence. Toute désintégration d'un positon se caractérise par l'émission de deux photons gamma de 511 keV dans des directions opposées. Cette propriété est utilisée par les TEP pour déterminer la projection du lieu d'annihilation, au moyen de deux détecteurs indépendants qui mesurent quasi simultanément deux photons de 511 keV. Pour se faire, des détecteurs élémentaires sont répartis en couronne autour du patient. Le circuit électronique accepte la coïncidence si les deux événements arrivent dans une fenêtre temporelle (τ) de l'ordre de 10 ns et si les deux photons ont une énergie voisine de 511 keV. La reconstitution des données constitue la dernière étape, permettant de recréer l'image de la distribution radioactive au sein du patient.

II.1.2.2 La reconstruction tomographique

Celle-ci permet l'obtention d'une image reflétant la biodistribution tridimensionnelle du traceur, tous les éléments de projection d'une coupe sont rangés dans une matrice appelée sinogramme. Chaque ligne de cette matrice correspond à la projection monodimensionnelle de la coupe pour un angle particulier. Cette matrice a autant de lignes que d'angles de mesure et autant de colonne que de cases de mesures pour une position angulaire. Un point du sinogramme correspond à une ligne de réponse entre deux détecteurs élémentaires.

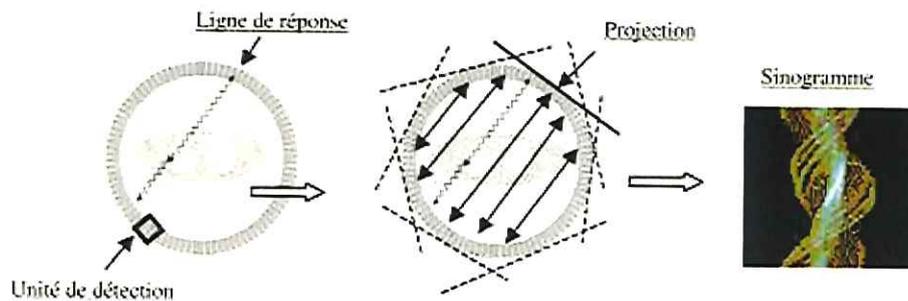


Figure 18 : Etapes de fabrication du sinogramme (Nalis 2009)

L'information reportée dans le sinogramme correspond à l'intégrale des émissions des photons de 511 keV émis suivant cette incidence, pour tous les points de l'objet situés sur la ligne de réponse. Chaque évènement accepté par le circuit de coïncidence incrémente d'une unité un pixel du sinogramme correspondant à la ligne de réponse entre les détecteurs élémentaires. L'étape de mesure TEP consiste alors à remplir les différents pixels du sinogramme. L'acquisition des données résulte d'un comptage dont les fluctuations statistiques sont régies par la loi de Poisson.

Le mode 2D consiste à ne sélectionner que les incidences $\theta = 0^\circ$ grâce à des « septa » qui arrêtent les rayonnements qui ne sont pas émis perpendiculairement au plan du détecteur, tandis que le mode 3D prend en compte la détection sous tous les angles. Le mode d'acquisition 3D augmente significativement la sensibilité du système, ce qui permet de réduire les activités injectées et/ou la durée des examens.

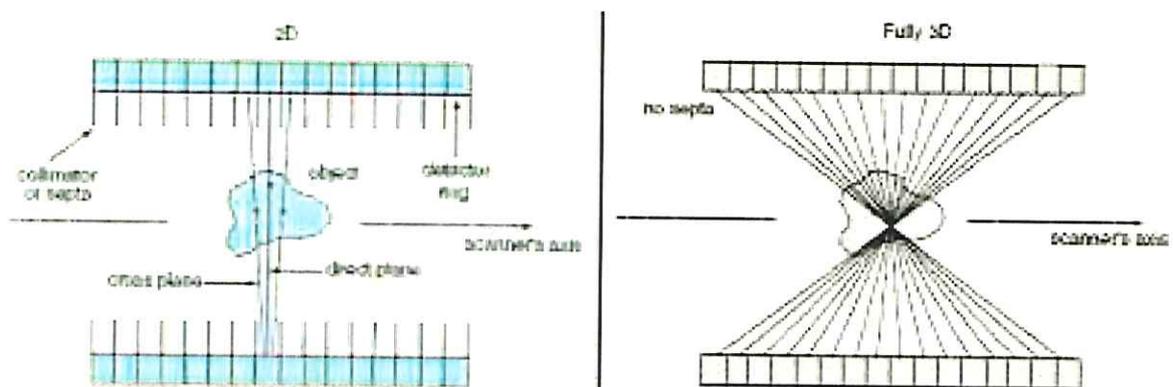


Figure 19 : Comparaison du mode 2D (gauche) et du mode 3D (droite) (Nalis 2009)

II.1.2.3 Quantification

La connaissance précise de la quantité de traceur fixée par les différentes lésions doit permettre de :

- Comparer les patients entre eux
- Visualiser l'évolution des lésions (après prise d'un traitement par exemple).

La première étape consiste à corriger l'image en éliminant les évènements aléatoires (données d'émissions) de mesure et en corrigeant les phénomènes d'atténuation (données de transmission).

L'obtention d'une quantification absolue requiert une calibration du tomographe, souvent réalisée à l'aide de la mesure d'un fantôme (cylindre remplie d'eau radioactive de concentration connue, mimant un corps humain). Le facteur d'étalonnage est alors déterminé, en comparant le nombre de « coups/pixels » à la concentration radioactive « kBq/mL » déterminée lors du remplissage du fantôme.

En pratique clinique, la méthode de quantification fait l'objet d'une normalisation qui tient compte de l'activité injectée et de la morphologie du patient. Cette valeur normalisée est appelée SUV (Standardized Uptake Value) : son calcul est basé sur le rapport entre la fixation du traceur et la dilution homogène du traceur dans le volume du patient.

$$SUV = \frac{\text{Fixation}}{\text{Activité Volumique}}$$

Fixation : Bq/mL

Activité Volumique : Bq/mL

Une valeur de SUV de 1 signifie que l'activité est diluée de manière homogène dans le volume. Une valeur de SUV 5 fois supérieur au niveau d'une lésion montre qu'il existe une fixation 5 fois plus importante dans cette lésion par rapport à la dilution uniforme du MRP.

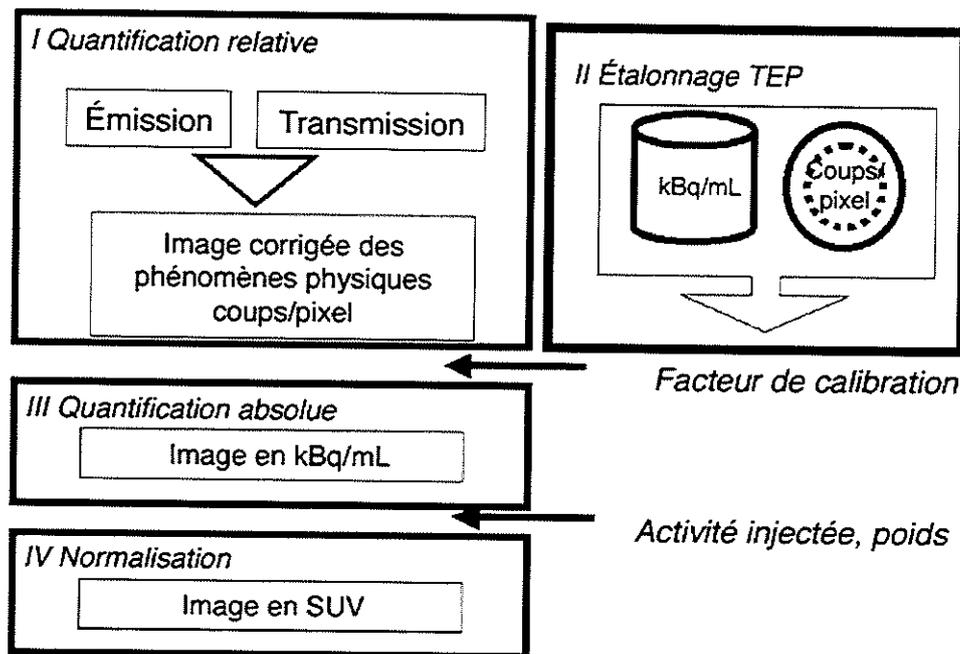


Figure 20 : Etapes avant l'obtention du SUV (de Dreuille et al. 2004)



II.2. Production de médicaments radio pharmaceutiques fluorés

Parmi les nombreux isotopes émetteurs de rayonnement β^+ vu ci-dessus, nous n'évoquerons ici que le ^{18}F .

Tableau 2 : Avantages et inconvénients du marquage au ^{18}F

Avantages	<ul style="list-style-type: none">• Deux formes disponibles : anion ou cation, permettant de faire soit de la substitution nucléophile (SN) soit de la substitution électrophile (SE)• Nombreuses méthodes de radio fluoration• Liaison C-F souvent stable in vivo• Période physique de 109 min : utilisation en dehors des sites de production, distribution aux sites dépourvus de cyclotron• Forme fluorure, faible volatilité, risque de contamination plus faible qu'avec le ^{11}C• Production de fortes activités
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Pour certaines synthèses : nécessité d'activation, donc obligation d'utilisation de méthode multi-étages• Certaines molécules d'intérêt ne peuvent être fluorées sous peine de perte des propriétés pharmacologiques du ligand d'origine• Risque radiochimique si production de fluor électrophile (forme gazeuse)

Le ^{18}F est donc un émetteur β^+ privilégié pour le radio marquage, du fait de sa période physique, sa chimie largement connue et sa disponibilité via les cyclotrons.

II.2.1. Production du fluor 18

Comme mentionné précédemment, le fluor 18 est l'isotope le plus utilisé en TEP. C'est un isotope artificiel qui doit être synthétisé à l'aide d'un accélérateur de particules. Nous allons prendre comme exemple la production de fluor 18 par le cyclotron IBA du CHU de Toulouse.



Figure 21 : Cyclotron IBA - CHU Toulouse

II.2.1.1 Principe de fonctionnement du cyclotron

Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence mis au point en 1929 par E.O. Lawrence aux Etats-Unis. C'est un accélérateur de particules chargées destiné à produire un faisceau de particules, dans notre cas un faisceau de protons, grâce à l'utilisation d'un champ électromagnétique. Ces particules sont ensuite utilisées comme projectiles pour "bombarder" des atomes cibles et engendrer la réaction nucléaire.

II.2.1.2 Production de l'ion source

Cet ion source constitue la particule chargée à accélérer pour générer le faisceau de protons qui bombardera la cible. Les deux ions sources les plus souvent utilisés sont les ions hydrogène H^+ et deutérium D^+ .

Le choix de la source se fait en fonction du radioélément que l'on souhaite produire. Les ions H^+ permettent la production de ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F , tandis que les ions D^+ permettent de produire du ^{15}O et du $^{18}F_2$ (fluor électrophile).

Le principe de production des sources d'ions est le suivant : un volume de gaz (H_2 ou D_2) est transféré dans une chambre soumise à un champ électrique statique. Sous l'effet de ce champ, le gaz va s'ioniser. Le plasma ainsi obtenu est stabilisé par le champ magnétique (B). Ci-dessous les réactions d'ionisation :

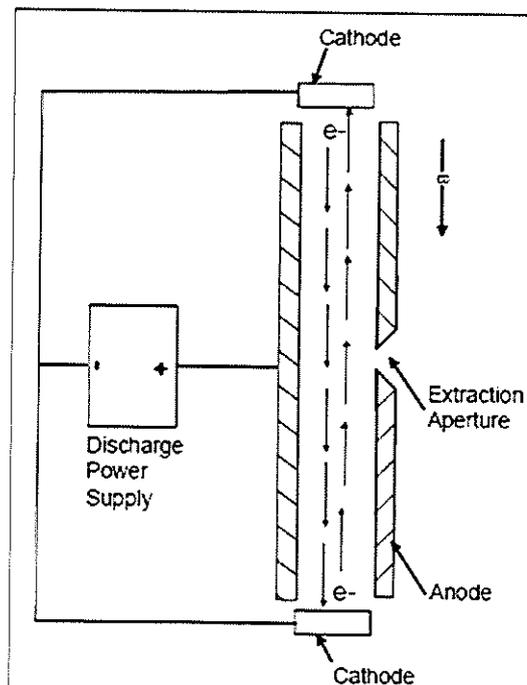


Figure 22 : Principe de création de l'ion source

Les ions produits sont ensuite extraits de cette chambre par une "cheminée" au centre du cyclotron afin de les transférer vers la zone d'accélération.



Figure 23 : Cheminées d'extraction de l'ion source

II.2.1.3 Accélération de l'ion source

La zone d'accélération est formée de deux cavités en forme de demi-cylindres : les « dees », séparées par un petit intervalle. L'injection de l'ion source dans cette zone est réalisée en son centre. L'ensemble est soumis à un vide poussé et est placé entre deux électro-aimants qui produisent le champ magnétique désiré.

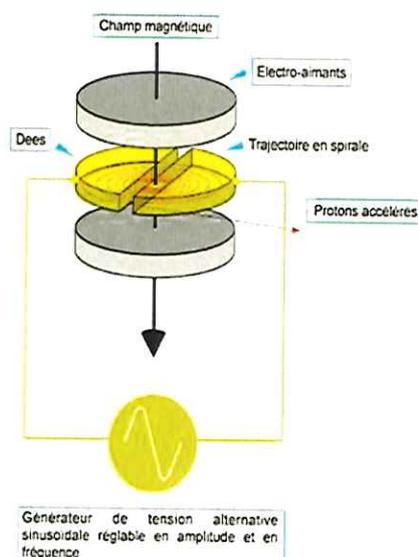


Figure 24 : Structure simplifiée du cyclotron

Les ions hydrures chargés vont être mis en mouvement. Ils ont une vitesse initiale, qui est celle du transfert depuis la chambre d'ionisation vers la zone d'accélération. Ils sont accélérés parallèlement au champ électrique appliqué entre les deux dees. Leur mouvement est ensuite courbé grâce au champ magnétique appliqué entre les électro-aimants entourant les deux dees.

II.2.1.4 Champ électrique

Le champ électrique E (en rouge ci-dessous) est dû à une tension alternative U appliquée entre les deux dees. L'hydrure est alors successivement attiré par le champ électrique positif puis repoussé par le champ électrique négatif.

Il a donc pour effet d'accélérer les H^- , qui reçoivent à chaque passage un « quantum d'énergie », augmentant ainsi leur vitesse et donc leur énergie cinétique. Les H^- sont donc accélérés une fois par demi-tour soit deux fois par tour, à chaque sortie d'un dee.

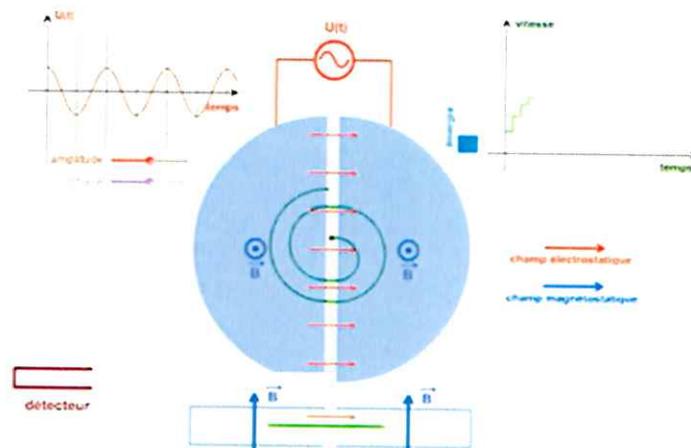


Figure 25 : Trajectoire des ions hydrures sous l'impulsion des champs électriques et magnétiques

II.2.1.5 Champ magnétique

Lorsque les particules entrent dans l'un des dees, elles ne sont plus soumises au champ électrique mais seulement au champ magnétique, qui leur impose une trajectoire circulaire de rayon $r = mv / qB$.

NOTA : Le module de la vitesse (v) des particules ne varie pas au sein d'un dee.

La vitesse angulaire est indépendante du rayon de la trajectoire, donc finalement de la vitesse linéaire des particules. Quelle que soit leur vitesse, les particules mettent le même temps pour décrire un cercle (ou ici un demi-cercle...).

Elles décrivent donc une succession de demi-cercles de rayon en augmentation, jusqu'à leur sortie du dispositif. Leur vitesse est alors directement liée au rayon du dernier demi-cercle.

II.2.1.6 Le vide

Afin que les ions accélérés n'interagissent pas avec d'autres molécules, la zone d'accélération des ions est soumise à un vide poussé qui doit être inférieur à 4×10^{-5} mbar.

II.2.1.7 Du faisceau d'hydrures au faisceau de protons

Une fois que l'association du champ magnétique et du champ électrique a permis d'accélérer les hydrures, les électrons périphériques de ces derniers doivent être éliminés de façon à ne conserver que le proton. Cette élimination est obtenue par l'interposition d'une feuille de carbone (stripper) devant le faisceau d'ions, captant les électrons périphériques.



Il en résulte en sortie un faisceau constitué uniquement de protons. Ces particules seront éjectées de l'accélérateur avec l'énergie adéquate à partir de la dernière trajectoire, puis guidées sur la cible.

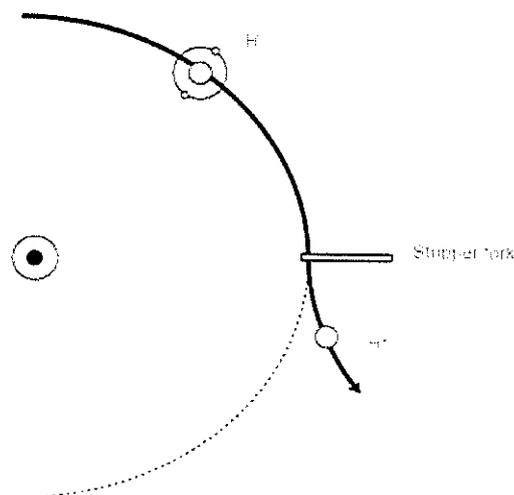


Figure 26 : Production du proton via le stripper

II.2.1.8 Bombardement de la cible

La cible constitue un réservoir étanche contenant la substance à bombarder. Dans le cas de la synthèse du ^{18}F , la cible contient de l'eau enrichie à 95% en oxygène 18 (^{18}O) : $^1_1\text{H}_2\ ^{18}_8\text{O}$.

Il se produit la réaction suivante : $^{18}_8\text{O} + ^1_1\text{p} \rightarrow ^{18}_9\text{F} + ^1_0\text{n}$.

Le cyclotron IBA cyclone 10/5 du CHU de Toulouse permet la production du ^{18}F par la réaction nucléaire $^{18}\text{O} (p,n)^{18}\text{F}$, induite par un faisceau de protons d'énergie de 10 MeV sur une cible constituée de 2.5 mL d'eau enrichie à 95 % en isotope ^{18}O .

Les conditions typiques d'irradiation sont :

- Intensité de courant 37.5 μA (régime simple faisceau),
- Durée d'irradiation 60 min, permettant d'obtenir approximativement 37 GBq de ^{18}F .

Immédiatement après la fin du « tir », la solution d'eau enrichie irradiée contenant le ^{18}F sous forme de fluorure est transférée sous pression d'hélium vers l'entrée du module de synthèse.

II.2.2. Synthèse d'un radio-traceur

II.2.2.1 Module de synthèse

Devant les activités importantes de ^{18}F mises en jeu lors des synthèses, il y a obligation d'automatiser les étapes de synthèse. Ceci permet de garantir la reproductibilité des synthèses et d'assurer la sécurité du personnel en termes de radioprotection. Un automate de synthèse permet de réaliser selon un enchaînement bien précis l'ensemble des étapes : de la purification de l'isotope jusqu'à la production de la solution mère du radiopharmaceutique. Différents modules de synthèse sont présents sur le marché avec chacun des techniques de

fluoration et des méthodes de purification particulières. L'automate de fluoration au CHU de Toulouse est le 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.

Ce système possède :

- 25 électrovannes à 2 ou 3 voies
- 1 réacteur en verre traité
- 9 entrées possibles de substrats
- 1 sortie HPLC
- 5 compteurs Geiger-Müller

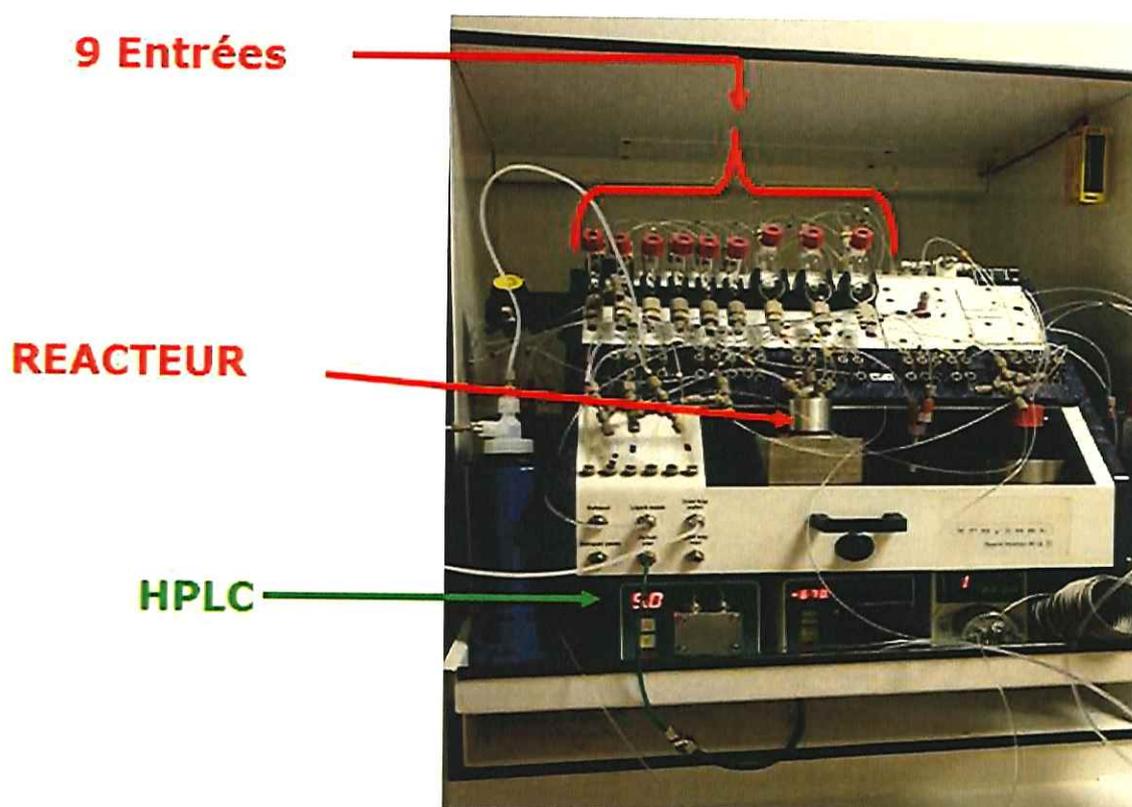


Figure 27 : Automate de synthèse Synchron R&D®

II.2.2.2 Les voies de synthèse

Il existe deux méthodes de fluoration :

- La fluoration nucléophile
- La fluoration électrophile.

II.2.2.2.1. Fluoration nucléophile

La substitution nucléophile par le F^- permet la production d'une grande variété de MRP, avec des rendements et des activités spécifiques élevés. La réaction nucléaire de type ^{18}O (p,n) ^{18}F permet d'obtenir le ^{18}F en solution sous forme fluorure de potassium (K^+F^-).

Le $^{18}\text{F}^-$ est ensuite séparé de l'eau enrichie dans lequel il est solubilisé, par l'intermédiaire d'une résine échangeuse d'ions (cartouches sep pak appelée QMA). Cette séparation a deux

objectifs : récupérer l'eau enrichie irradiée et obtenir le fluorure sous forme anhydre. Le fluorure n'étant réactif qu'en milieu organique, il est nécessaire d'en éliminer l'eau. Afin de l'extraire de la résine on utilise une solution de carbonate de potassium (K_2CO_3) concentrée qui déplace la liaison sur la cartouche. Enfin pour le dissoudre dans un milieu organique, on utilise des sels de tétra-alkyl ammonium ou des aminopolyéthers (Kryptofix 2.2.2). Ceux-ci jouent également le rôle de « catalyseur » car ils vont activer le fluor en encageant l'ion alcalin (ici K^+), rendant le fluor disponible pour des réactions radiochimiques. Le solvant organique le plus fréquemment utilisé est l'acétonitrile. Après ajout du précurseur, une réaction de substitution nucléophile se produit alors dans ce milieu en chauffant entre 80 °C et 160 °C pendant 10 à 30 min (les conditions expérimentales sont à redéfinir pour chaque précurseur).

La fluoration nucléophile peut s'effectuer de deux façons :

- Synthèse en une étape : substitution d'un groupement chimique « partant » du précurseur, par le ^{18}F (exemple : groupement tosylate, Ts)

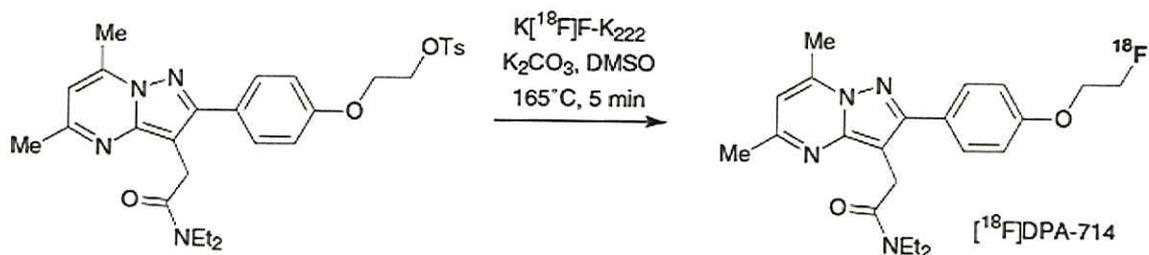


Figure 28 : Synthèse du $[^{18}F]$ DPA-714 en une étape (Damont et al. 2008)

- Synthèse en deux étapes :

Étape 1 : préparation d'un intermédiaire fluoré par substitution nucléophile avec du ^{18}F - (par exemple utilisation de 1,2 bistosylethoxyane ou « ditosyl », possédant 2 groupements « partant »)

Étape 2 : alkylation de cet intermédiaire sur le précurseur.

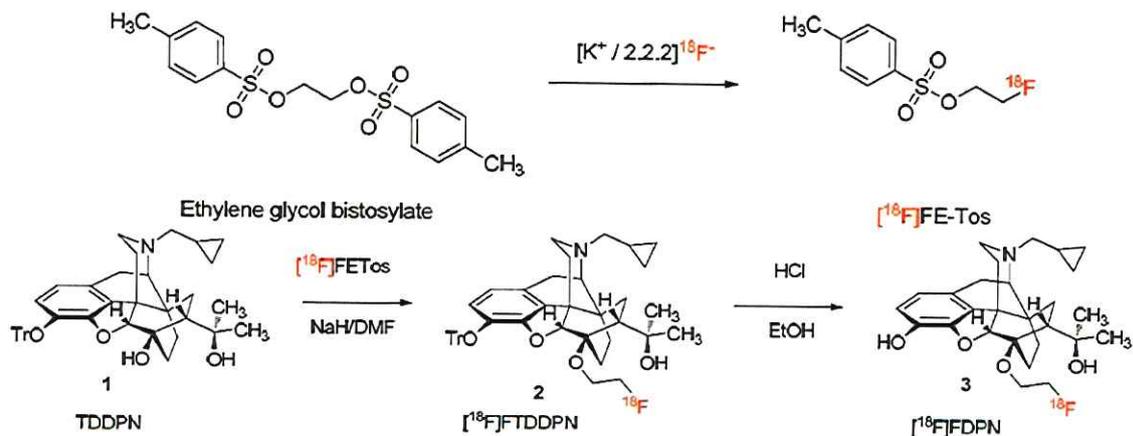


Figure 29 : Synthèse du $[^{18}F]$ FDPN en deux étapes (Schultz et al. 2013)

NOTA : la synthèse ci-dessus contient une troisième étape consistant à éliminer en milieu acide les groupements protecteurs.

Le précurseur doit avoir un groupe « partant » situé à l'endroit où l'on souhaite introduire le ^{18}F . Les groupes partants les plus utilisés sont les triflates, les tosylates, les mésylates et les nosylates.

Si la substitution nucléophile a lieu au niveau d'un noyau aromatique, les groupements partants sont souvent le nitro (NO_2), le triméthylammonium ou le ^{18}F et le noyau aromatique doit être activé par la présence en ortho ou para de groupes électroattracteurs.

Si le précurseur possède des sites possiblement attaquables par la substitution nucléophile et qui doivent rester intact, il est nécessaire qu'ils possèdent des groupements protecteurs. Ces groupements doivent être facilement hydrolysables après substitution nucléophile.

II.2.2.2. Fluoration électrophile

La fluoration électrophile se fait par le biais du fluor sous forme gazeuse F_2 . La réaction nucléaire nécessaire à la production du $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ par le cyclotron est $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$.

Afin de récupérer le $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ dans le réacteur, il y a nécessité d'injecter dans la cible du cyclotron du fluor froid entraîneur, qui a pour inconvénient de diminuer l'activité spécifique.

La fluoration par le F_2 peut être directe mais nécessite le plus souvent la production d'une molécule intermédiaire afin de le rendre moins réactif et limiter les réactions indésirables.

Le fluor électrophile permet des réactions d'addition sur doubles liaisons ou noyaux aromatiques ; cependant ces dernières n'étant pas toujours régio-sélectives, il est préférable d'utiliser des réactions de démétallation comme par exemple dans synthèse de la $[^{18}\text{F}]\text{FluoroDOPA}$.

En effet le groupe trialkyl-étain (SnMe_3) exerce un effet électro-donneur sur le carbone aromatique, qui constituera le lieu « d'attaque » du fluor électrophile, garantissant la régio-sélectivité de la réaction.

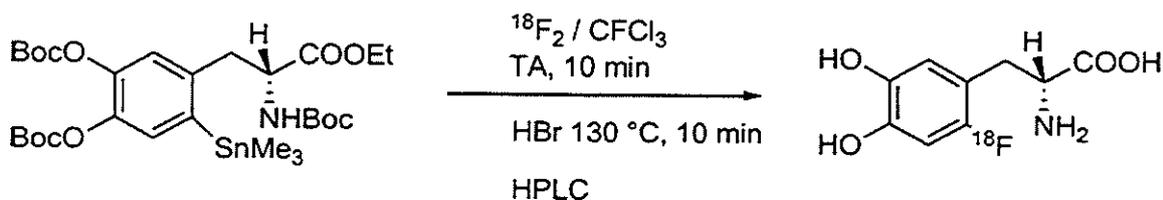


Figure 30 : Synthèse par substitution électrophile de la $[^{18}\text{F}]\text{FluoroDOPA}$ (Le Bars 2005)

II.2.2.3 Purification

Une fois la synthèse terminée, dans la plupart des cas, trois composés chimiques sont présents dans le réacteur :

- Le ^{18}F n'ayant pas réagi
- Le précurseur froid qui n'a pas réagi
- Le précurseur fluoré

En général, le précurseur contient des groupements protecteurs qui nécessitent d'être hydrolysés pour libérer la molécule d'intérêt.

Afin de séparer cette dernière des impuretés, il est nécessaire de procéder à une purification. Pour se faire, deux procédés existent qui peuvent être utilisés seuls ou combinés.

II.2.2.3.1. Purification sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction)

L'extraction en phase solide est une technique de plus en plus répandue en raison de sa rapidité et de son efficacité. Le principe repose sur l'adsorption de la molécule d'intérêt sur une phase stationnaire (contenue dans une cartouche) que l'on récupère ensuite lors de l'élution. Des lavages successifs permettent d'éluer les impuretés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

La purification sur cartouche SPE se décompose en quatre étapes :

- Activation de la phase solide en faisant percoler un solvant dans la cartouche. Celle-ci ne doit pas sécher avant dépôt de l'échantillon.
- Dépôt de l'échantillon.
- Lavage en utilisant un solvant qui élue les impuretés sans décrocher la molécule d'intérêt.
- Élution de la molécule d'intérêt avec un faible volume de solvant approprié.

II.2.2.3.1.1. Pré-purification

La purification SPE peut être utilisée en complément de la purification HPLC dans le cadre d'une pré-purification, c'est-à-dire en amont de l'HPLC, afin d'éliminer le plus gros des impuretés qui pourraient endommager la colonne.

Exemple : pré-purification du [¹⁸F]DPA-714

Le DPA-714 est une molécule lipophile et apolaire qui est facilement adsorbé sur une cartouche C18. Le lavage s'effectue avec de l'eau purifiée (solvant polaire), tandis que l'élution du DPA-714 est réalisée avec 2 mL d'éthanol.

II.2.2.3.1.2. Post-purification

La purification SPE peut être utilisée en complément de la purification HPLC dans le cadre d'une post-purification, en aval de la colonne HPLC, dans le but d'éliminer la phase mobile qui n'est pas toujours compatible avec la mise en forme pharmaceutique (exigences toxicologiques).

Exemple : post-purification du [¹⁸F]DPA-714

Lors de la synthèse du DPA-714, la purification SPE est utilisée également après l'HPLC, permettant l'élimination d'une partie des impuretés ainsi que la phase mobile de la colonne éthanol / acétate de sodium 0.1M (45/55).

En sortie de colonne HPLC, la phase mobile contenant le pic de [¹⁸F]DPA-714 est mélangée à 100 mL d'eau stérile, puis passée sur une cartouche C18 qui retiendra le [¹⁸F]DPA-714. Le [¹⁸F]DPA-714 est ensuite élué de la C18 par 1 mL d'éthanol. La post-purification permet ainsi de concentrer le produit.

II.2.2.3.2. Purification HPLC

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire (colonne chromatographique). La phase mobile, en phase

isocratique, poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ils sont ensuite mis en évidence en sortie de colonne grâce à deux détecteurs :

- Gamma : pour les radionucléides
- UV : pour les autres composés (cf. figure ci-dessous).

Cette méthode permet de séparer les différents composés. Grâce à des essais préalables, on connaît le temps de rétention de notre molécule d'intérêt, du fluor libre et des autres impuretés avec un solvant donné. Ceci nous permet alors de sélectionner le pic de notre composé d'intérêt et ainsi de le collecter en sortie de colonne. Notre composé est ainsi caractérisé et dissous dans le solvant d'éluion.

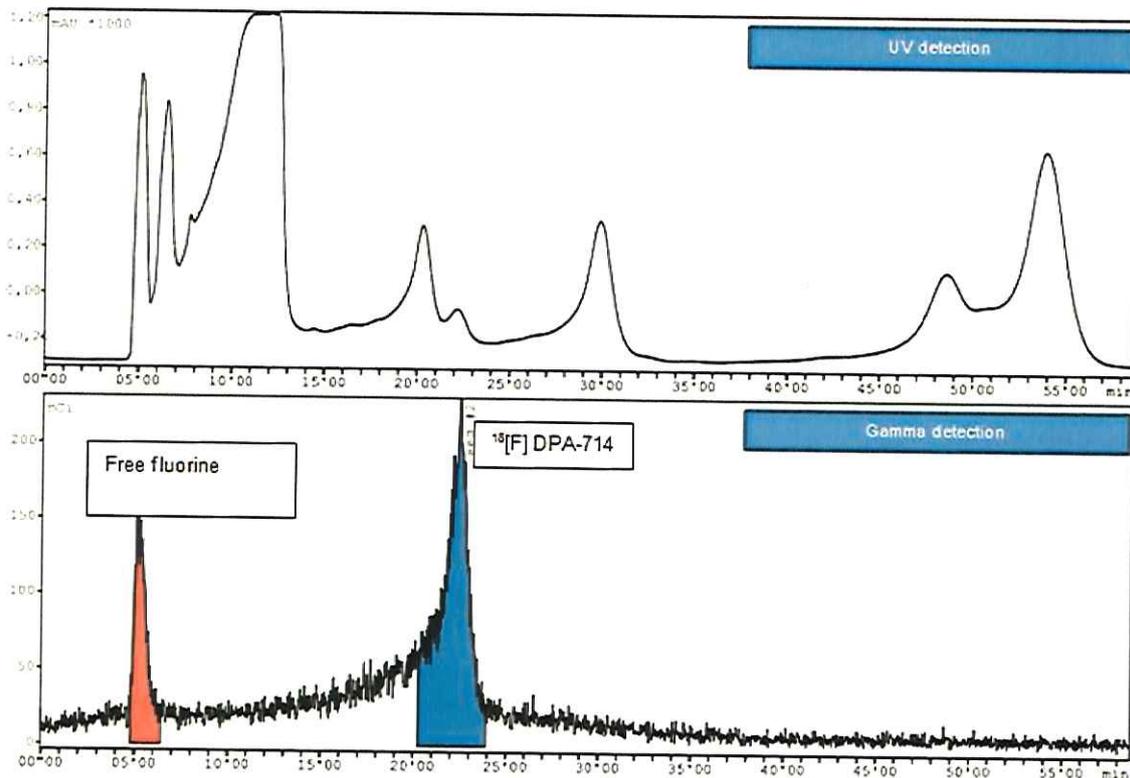


Figure 31 : Chromatogramme de synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ en double détection (UV et gamma) en sortie de colonne

Le premier pic correspond au ^{18}F libre n'ayant pas réagi, tandis que le deuxième correspond à la molécule d'intérêt : le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$. Ces chromatogrammes permettent de recueillir en sortie de colonne la molécule à synthétiser.

II.2.2.4 Mise en forme pharmaceutique

Une fois le radio-pharmaceutique recueilli, celui-ci doit être mis en forme dans un solvant biologiquement compatible à l'injection.

Selon la nature de la phase mobile de la colonne HPLC, il sera plus ou moins nécessaire de procéder à une nouvelle purification sur une cartouche SPE. En cas de solvants non-toxiques, la fraction collectée sera complétée avec des solvants biologiquement compatibles afin d'ajuster le pH (bicarbonate de sodium) et/ou l'osmolarité (sérum physiologique). Si la phase

mobile contient des solvants toxiques (méthanol, acétonitrile), la fraction collectée sera purifiée sur une cartouche SPE (type C18) puis sera éluée avec un solvant biologiquement compatible (éthanol par exemple). Cependant, au vu des exigences toxicologiques de la Pharmacopée Européenne (<100 mg/mL), il sera nécessaire de diluer la fraction récupérée dans du sérum physiologique.

Il est nécessaire ensuite de procéder à une stérilisation du MRP obtenu, par filtration stérilisante, via un filtre dont le diamètre des pores est de 0.22 µm, le tout dans une enceinte de classe A.

II.2.2.5 Contrôles qualité du produit fini

Parmi l'ensemble des contrôles à réaliser sur le MRP, on peut distinguer les tests à réaliser en routine et les tests supplémentaires obligatoires pour valider le procédé de fabrication.

Nous verrons dans la partie réglementation que pour être autorisé à utiliser un MRP expérimental, il faut avoir validé en amont le procédé de fabrication grâce à la production de trois lots qui seront soumis à des tests complémentaires en plus de ceux de routine. Ceci est nécessaire à la rédaction du dossier de médicament expérimental (DME), particulièrement le DME 1 relatif à la qualité pharmaceutique et chimique du produit.

II.2.2.5.1. Contrôles qualité en routine

Parmi les contrôles qualité (CQ) à réaliser en routine, il y a :

- **Aspect macroscopique** de la solution.
- **pH** : par dépôt de 10 µL de solution finale sur du papier pH, de sensibilité 1 unité pH. La couleur obtenue est comparée à l'échelle de couleur fournisseur par le fabricant.
- **Pureté radiochimique (PRC)** : par HPLC analytique couplée à un détecteur gamma et un détecteur UV.

Procédé : 500 µL de la solution finale sont injectés dans le système HPLC équipé d'une phase stationnaire lipophile (colonne greffée en C18), qui va séparer la molécule synthétisée des impuretés, avec détection en sortie de colonne par les détecteurs gamma et UV. La PRC est déterminée en calculant le rapport de l'aire du pic de la molécule d'intérêt sur la somme des aires de chaque pic. Le temps de rétention de la molécule d'intérêt est connu grâce un standard non radioactif.

- **Pureté chimique** :
 - Détection des résidus de Kryptofix 2.2.2. par test colorimétrique.
Procédé : test avec de l'acide iodoplatinique selon la méthode décrite par Mock (Mock, Winkle, et Vavrek 1997). Procédé identique à la Pharmacopée européenne concernant la solution injectable de FDG (01/2014 ; n° 1325) Norme : < 2.2 mg/Vmax.
 - Détection d'impuretés en spectroscopie UV : permet l'identification et la quantification des substances « froides » présentes dans l'échantillon (test matières premières, produits secondaires de synthèse, ...)
- **Activité volumique** : déterminée par mesure de la radioactivité du produit final par un activimètre calibré, et par mesure du volume final. Le rapport de l'activité sur le volume donne l'activité volumique en GBq/mL.
- **Test d'intégrité des filtres** : ce test correspond au test du point de bulle décrit dans la pharmacopée européenne (Chapitre 5.1.1. 01/2008 : monographie 50101 méthodes de

préparation des produits stériles) (« Pharmacopée européenne 9e Edition | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament » 2017)

- **Pureté radio-nucléidique (PRN)**

- Période physique T ou « demi-vie » : le calcul de la demi-vie est une indication de la pureté radio-nucléidique.

Procédé : mesure des activités (A_1 et A_2) d'un volume de la solution finale, à deux temps distincts t_1 et t_2 ($t_2 > t_1$) à l'aide d'un activimètre calibré. Le calcul de la période physique est :

$$T = \frac{\ln 2 \times (t_2 - t_1)}{\ln A_1 - \ln A_2}$$

- Par spectrométrie gamma : l'analyse du spectre gamma permet de caractériser le radionucléide.

Procédé : quelque μL de la solution finale sont placés devant un spectrophotomètre gamma calibré (cristal d'iodure de sodium dopé au thallium NaI(Tl) ou cristal de germanium). Un pic unique doit être observé à 511 keV. Cependant tous les émetteurs β^+ émettent via l'annihilation un gamma à 511 keV. Il est donc nécessaire, après décroissance du ^{18}F (+24H) de faire une nouvelle mesure : aucun pic ne doit être mis en évidence.

II.2.2.5.2. Contrôles qualité différés

Les tests de stérilité et des endotoxines sont réalisés sur chaque production mais ne sont pas libératoires étant donné que leurs résultats sont différés.

- **Stérilité** : le contrôle de la stérilité est fait selon les exigences de la pharmacopée européenne (Monographie 0125 : Préparations Radiopharmaceutiques)

Procédé : mise en culture sur milieux spécifiques pour bactéries aérobies et anaérobies, et prélèvements mycologiques. 1 mL de solution finale est mis en culture dans chaque milieu : un tube thioglycolate à 37 °C (aérobies), un tube trypticase soja à 30-35 °C (anaérobies sous atmosphère de CO_2) et un tube Sabouraud à température ambiante. Aucun trouble des milieux ne doit être observé après 14 jours.

Une mise en culture témoin avec de l'EPPI est faite selon un procédé identique.

Ce test est qualifié de test différé puisque le résultat est connu après que la solution ait été injectée au patient.

- **Pyrogénicité** : test des endotoxines bactériennes, selon la monographie 20615 (04/2016) section 2.6.14.

Enfin, le dernier test est le **dosage des solvants résiduels** qui est uniquement réalisé sur les lots destinés à la rédaction du DME 1. Selon les solvants utilisés pour la purification HPLC, il est nécessaire de les doser par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en conformité avec la Pharmacopée Européenne. Les taux limites sont renseignés dans l'ICH (Internal Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use).



Tableau 3 : Récapitulatif des CQ sur le produit fini (« Pharmacopée européenne 9e Edition | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament » 2017)

Tests	Méthodes	Spécifications
CQ en routine		
Apparence de la solution	Inspection visuelle	Solution limpide et incolore, exempte de particules
Identification radio-nucléidique	Décroissance du fluor	Période physique : 105-115 min
	Spectrométrie gamma	Pic à 511 keV
pH	Papier pH	4 - 8
Activité volumique	Calcul	A définir selon le composé
Concentration radioactive	Chambre d'ionisation	A définir selon le composé
Pureté radiochimique	HPLC et CCM	>95 %
Pureté chimique : Kryptofix 222 Impuretés UV	Spot test HPLC	≤ 2.2 mg / V _{max} A définir selon le composé Souvent < 10µg / V _{max}
Stérilité	Inoculation directe	Stérile
Endotoxine bactérienne	Test LAL	< 17.5 UI/mL
Test d'intégrité des filtres	Point de bulle	> 50 Psi (ou 3.45 Bars)
Tests complémentaires en validation de procédé		
Pureté chimique : Solvant résiduels	CPG	Normes ICH : Acétonitrile ≤ 4.1mg/V _{max} ou 410 ppm Ethanol ≤ 10% (m/V) Acétone ≤ 5000 ppm DMSO ≤ 5000 ppm

II.2.2.6 Réglementation des médicaments expérimentaux

II.2.2.6.1. Médicament expérimental : définition ANSM

Principe actif sous forme pharmaceutique ou placebo expérimenté ou utilisé comme référence dans un essai clinique, y compris les produits bénéficiant déjà d'une autorisation de mise sur le marché, mais utilisés ou formulés (présentation ou conditionnement) différemment de la forme autorisée, ou utilisés pour une indication non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples informations sur la forme autorisée.

Le [¹⁸F]DPA-714 est à ce jour un médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE), utilisé dans le cadre d'essais cliniques.

II.2.2.6.2. Essai clinique : définition ANSM

Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'Être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. Les essais cliniques portant sur les médicaments ont pour objectifs, selon le cas, d'établir ou de vérifier certaines

données pharmacocinétiques (modalités de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du médicament), pharmacodynamiques (mécanisme d'action du médicament notamment) et thérapeutiques (efficacité et tolérance) d'un nouveau médicament ou d'une nouvelle façon d'utiliser un traitement connu.

Depuis la parution du décret d'application de la loi Jardé (n°2016-1537 du 16 novembre 2016) publié le 17 novembre 2016, et entré en application le 18 novembre 2016, le terme de "recherche biomédicale" est remplacé par "recherche impliquant la personne humaine" (RIPH).

II.2.2.6.3. Contexte réglementaire de la synthèse d'un MRPE

L'article R5126-9 du Code de la Santé Publique autorise "sous réserve de disposer des moyens en locaux, personnel, équipements et systèmes d'information nécessaires, les pharmacies à usage intérieur (PUI) [...] à exercer les activités prévues aux articles L. 5126-5 et L. 5137-2, notamment : [...] la réalisation des préparations rendues nécessaires par les recherches impliquant la personne humaine mentionnées à l'article L. 5126-11, y compris la préparation des médicaments expérimentaux mentionnée à l'article L. 5126-5 et [...] la préparation des médicaments radiopharmaceutiques [...]." (*Code de la santé publique - Article R5126-9 2017*). Cette autorisation est délivrée par le directeur général de l'agence régionale de santé (ARS) du lieu d'implantation (article R.5126-16 du CSP) (*Code de la santé publique - Article R5126-16 2017*).

Dans le cadre de la production d'un MRP, une autorisation d'exercer une activité nucléaire doit être délivrée par le président de l'Agence de Sûreté Nucléaire (ASN) (*Code de la santé publique - Article L1333-4, s. d.; Code de la santé publique - Article R1333-17, s. d.*) (cf. Annexe 3)

II.2.2.6.4. Les acteurs de la recherche

- Le promoteur

" Personne physique ou personne morale qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale sur l'être humain, qui en assure la gestion et qui vérifie que son financement est prévu. Celui-ci ou son représentant légal doit être établi dans la Communauté européenne." (*Code de la santé publique - Article L1121-1 2017*)

- L'investigateur

" Personne physique qui dirige et surveille la réalisation de la recherche sur un lieu de recherche. Lorsque le promoteur d'une recherche biomédicale confie sa réalisation à plusieurs investigateurs, sur un même lieu ou sur plusieurs lieux en France, le promoteur désigne parmi les investigateurs un coordonnateur. " (*Code de la santé publique - Article L1121-1 2017*)

- Les participants

Les participants peuvent être des patients comme des volontaires sains. " L'intérêt des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale portant sur un médicament prime toujours les seuls intérêts de la science et de la société. " (Code de la santé publique - Article L1121-2 2017)

II.2.2.6.5. Mise en place d'un essai clinique

La recherche impliquant la personne humaine nécessite un enregistrement, avant toute demande d'autorisation et demande d'avis auprès des autorités compétentes :

- Au niveau européen : dans la base de données EudraCT (n°EudraCT), dans le cadre de recherches interventionnelles portant sur le médicament. EudraCT est une base de données de tous les essais cliniques interventionnels portant sur des médicaments dans la Communauté européenne, soumis aux Comités de protection des personnes (en France : CPP) et à l'autorité compétente (ANSM) à partir du 1er mai 2004.
- Au niveau national : auprès de l'ANSM, qui délivre un identifiant RCB (n°ID-RCB), qui est un identifiant unique pour les recherches en France. Ceci concerne toutes les RIPH, hormis la recherche sur le médicament.

Après l'enregistrement, l'ANSM doit obligatoirement donner son autorisation pour que la mise en place ait lieu. L'ANSM autorise uniquement les recherches interventionnelles mentionnées au 1° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique portant sur les médicaments, les dispositifs médicaux, les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, les produits cosmétiques et de tatouage, les produits biologiques (produits sanguins labiles, préparation de thérapie cellulaire, tissus, organes), ainsi que celles ne portant pas sur des produits de santé. (« Recherches impliquant la personne humaine (RIPH) - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé » 2017)

Un dossier sera également déposé auprès des comités de protection des personnes (CPP). Un CPP se constitue de 14 membres titulaires et de 14 suppléants, dont 7 du domaine médical et 7 de la société civile. Le rôle des CPP est de s'assurer que tout projet de RIPH mené en France respecte les mesures (médicales, éthiques et juridiques) visant à assurer la protection des personnes qui participeront à cette recherche.

Les CPP sont présents au nombre de 40 au niveau national, répartis sur 7 inter-régions. Le CPP doit émettre un avis favorable pour que l'ANSM autorise l'essai clinique.

II.2.2.6.6. Les documents à fournir pour l'autorisation

- Au CPP

Pour examiner la conformité de l'essai, le CPP a besoin du dossier d'essai clinique (DEC) constitué de :

- La brochure investigateur
- L'attestation d'assurance
- Du protocole et résumé de l'essai.

- À l'ANSM

Pour autoriser le protocole, l'ANSM aura besoin :



- Du dossier administratif (DA)
- Du DEC
- Du dossier de médicament expérimental (DME), constitué de 3 parties :
 - o Partie 1 = DME 1 : données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique.
 - o Partie 2 = DME 2 : données non cliniques
 - o Partie 3 = DME 3 : données cliniques
- De l'avis favorable du CPP.



III. Synthèse du [^{18}F]DPA-714 : retour d'expérience

III.1. Revue de la littérature

Le DPA-714 et le [^{18}F]DPA-714 possèdent la même structure chimique mais ont cependant des procédés de fabrication bien distincts. En effet de par la période physique du ^{18}F (109.8 minutes), la radiosynthèse se doit d'être rapide afin de garantir lors de l'injection des activités spécifiques et volumiques élevées.

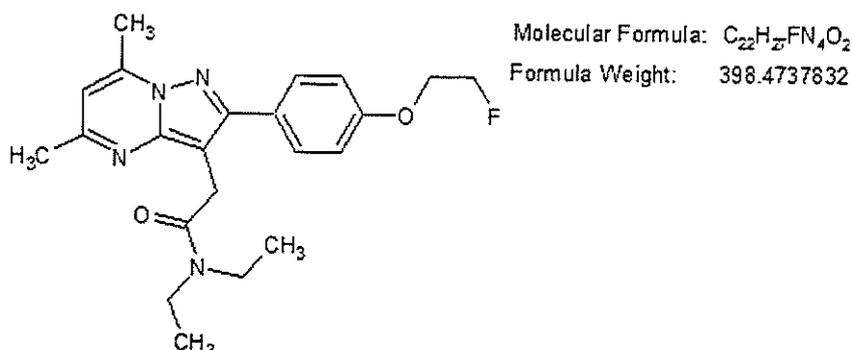


Figure 32 : Structure, formule et poids moléculaire du DPA-714

III.1.1. Synthèse du DPA-714

La synthèse du DPA-714 implique au cours de la synthèse une réaction de O-alkylation. Le précurseur de la réaction est le DPA-713.

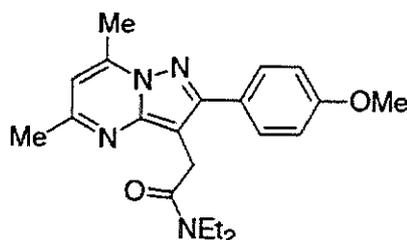


Figure 33 : Structure du DPA-713

Plusieurs voies de synthèse sont observées :

- Selon Damont :



Figure 34 : Synthèse du DPA-714 (Damont et al. 2008)

Le DPA-713 est O-déméthylé dans une solution 1M de tribromure de bore (BBr_3) dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2) à basse température (-60°C à -40°C) pendant 2h. Le dérivé phénolique réagit ensuite avec du 1-fluoro-2-tosyoxyéthane dans du tétrahydrofurane (THF) en présence d'hydrure de sodium (NaH) pendant 16h. Par cette synthèse le DPA-714 est obtenu avec un rendement d'environ 32%.

- Selon James :

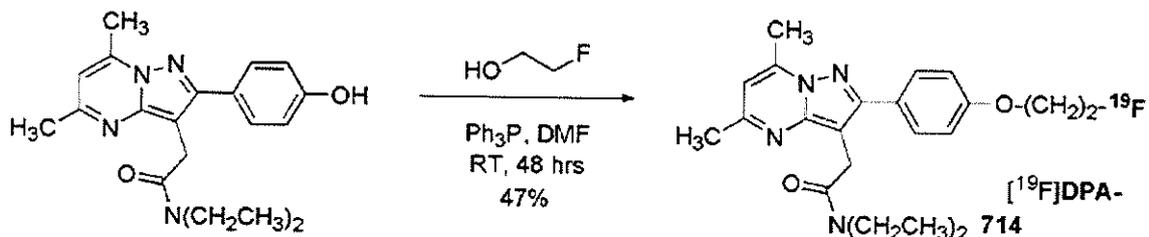


Figure 35 : Synthèse du DPA-714 (James et al. 2008)

Le dérivé phénolique réagit avec le 2-fluoroéthanol en présence de triphénylphosphine et de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) dans du N,N-diméthylformamide (DMF) anhydre à température ambiante, pendant 48h.

III.1.2. Synthèse du $[^{18}\text{F}]$ DPA-714

La synthèse du $[^{18}\text{F}]$ DPA-714 implique une substitution nucléophile d'un groupement tosylate (groupement partant) par le $^{18}\text{F}^-$ nucléophile. Comme pour le DPA-714, plusieurs voies de synthèses sont possibles, aussi bien pour la synthèse de l'intermédiaire tosylé, le tosyl-DPA-714 que pour l'étape de substitution nucléophile.

- Selon Damont :

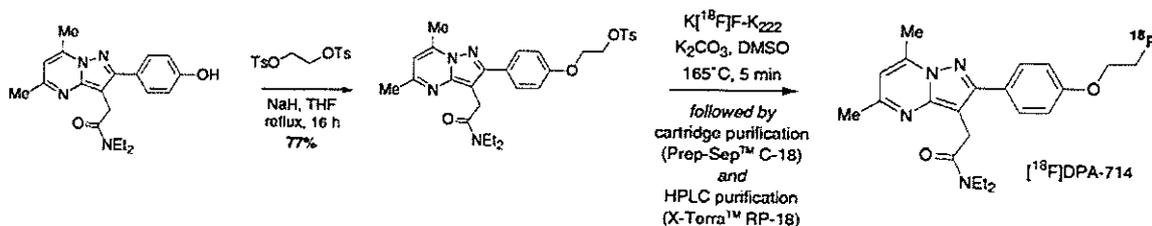


Figure 36 : Synthèse du tosyl-DPA-714 et du $[^{18}\text{F}]$ DPA-714 (Damont et al. 2008)

Le dérivé phénolique réagit avec du 1,2-di(tosyoxy)éthane dans du tétrahydrofurane (THF) en présence d'hydrure de sodium (NaH) pendant 16h. Le $^{18}\text{F}^-$ est activé par le Kryptofix® 2.2.2. qui complexe le cation potassium K^+ , puis réagit en présence de 4.5 mg à 5.0 mg de tosyl-DPA-714 dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 165°C pendant 5 minutes.

- Selon James :

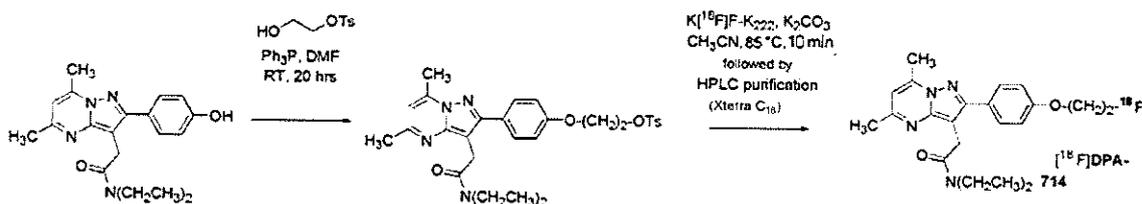


Figure 37 : Synthèse du précurseur tosylé et du [¹⁸F]DPA-714 (James et al. 2008)

La synthèse du tosyl-DPA-714 se fait selon la réaction de Mitsunobu, qui consiste au couplage du composé phénolique avec le tosylate d'hydroxyéthyle, en présence de DIAD et de triphénylphosphine dans du DMF, à température ambiante pendant 20h. La substitution nucléophile s'effectue ensuite dans de l'acétonitrile à 85°C pendant 10 minutes. Ce procédé de synthèse a été utilisé par Arlicot avec cependant des rendements de synthèse légèrement supérieurs (Arlicot et al. 2012).

- Selon Doorduïn :

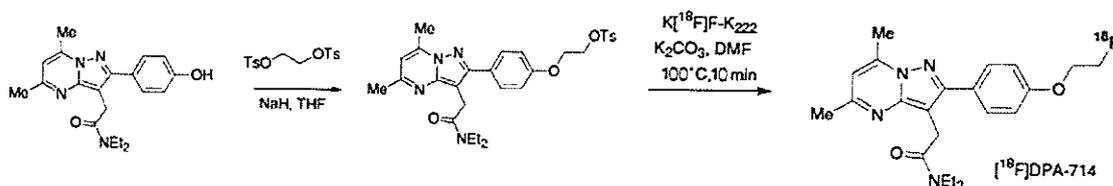


Figure 38 : Synthèse du précurseur tosylé et du [¹⁸F]DPA-714 (Doorduïn et al. 2009)

Le dérivé phénolique réagit avec du 1,2-di(tosyloxy)éthane dans du tétrahydrofurane (THF) en présence d'hydrure de sodium (NaH). Le ¹⁸F est activé par le Kryptofix® 2.2.2. qui complexe le cation potassium K⁺, puis réagit en présence de 1 mg de tosyl-DPA-714 dans 0.5 ml de diméthylformamide (DMF) à 100°C pendant 10 minutes.

Tableau 4 : Récapitulatif des synthèses de [¹⁸F]DPA-714 dans la littérature

Sources	Précurseur (mg)	Solvant	Température (°C)	Temps (min)	Rendement* (%)
James (2008)	2,5	ACN	85	10	≈ 6
Arlicot (2012)	2-2.5	ACN	85	10	[7-12]
Damont (2008)	4,5-5	DMSO	165	5	[15-20]
Doorduïn (2009)	1	DMF	100	10	[9-25]

(*) rendement global non corrigé de la décroissance radioactive

III.2. Mise en place et optimisation de la production de [¹⁸F]DPA-714 sur la plateforme de fluoruration

III.2.1. Contrôles qualité par HPLC analytique

L'objectif de ces contrôles est de valider et libérer le lot de production du MRPE. Ils permettent de s'assurer de l'absence de dérivés fluorés dans la préparation, et d'éliminer la présence possible de tosyl-DPA qui n'aurait pas réagi.

III.2.1.1 Mise en place de la méthode

La méthode a été mise au point en utilisant du tosyl-DPA et du [¹⁹F]DPA-714, présentant les mêmes caractéristiques chimiques que le [¹⁸F]DPA-714.

L'objectif de cette méthode a été de déterminer pour les composés ci-dessus les temps de rétention (t_R) respectifs et leurs limites de quantification dans les conditions analytiques suivantes :

Tableau 5 : Conditions d'HPLC analytique

Conditions	[¹⁹ F]DPA-714	Tosyl-DPA
Phase stationnaire	VYDAC 201HS5415 RP C18 90A PHARMACEUTICAL 150 x 4,6 mm 5 μ	
Phase mobile	Acétate de sodium 0,1M / Acétonitrile (60/40)	
Phase	Inverse	
Mode	Isocratique	
Débit	0,50 mL/min	
Longueur d'onde	254 nm	
Température	Ambiante : variable	
Quantités injectées	0,5 ng à 1 μ g	5 ng à 30 ng

III.2.1.1.1. Temps de rétention

Après le choix des conditions chromatographiques, le temps de rétention est validé par la qualité du chromatogramme ainsi que par sa reproductibilité tout au long des analyses qui suivent, avec des quantités injectées différentes.



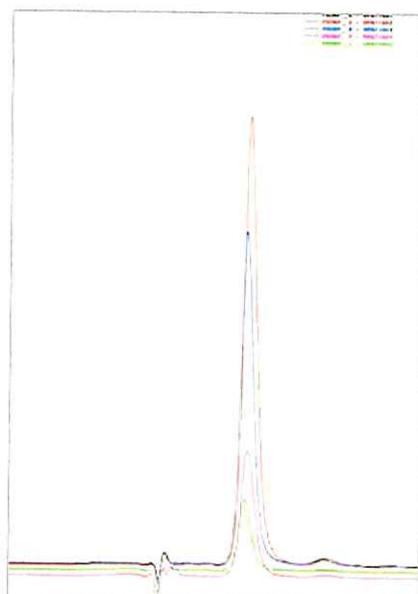


Figure 39 : superposition des chromatogrammes de $[^{19}\text{F}]\text{DPA-714}$ après injection de $0,1 \mu\text{g}$; $0,2 \mu\text{g}$; $0,5 \mu\text{g}$; $0,75 \mu\text{g}$ et $1 \mu\text{g}$ sur colonne analytique.

À l'issue des 78 analyses effectuées en HPLC analytique, le t_R du $[^{19}\text{F}]\text{DPA-714}$ a été estimé à $5,529 \text{ min}$ avec un écart type de $0,245 \text{ min}$ et un coefficient de variation de $4,43 \%$. Le front de solvant et le pic de $[^{19}\text{F}]\text{DPA-714}$ sont séparés d'un peu plus d'une minute.

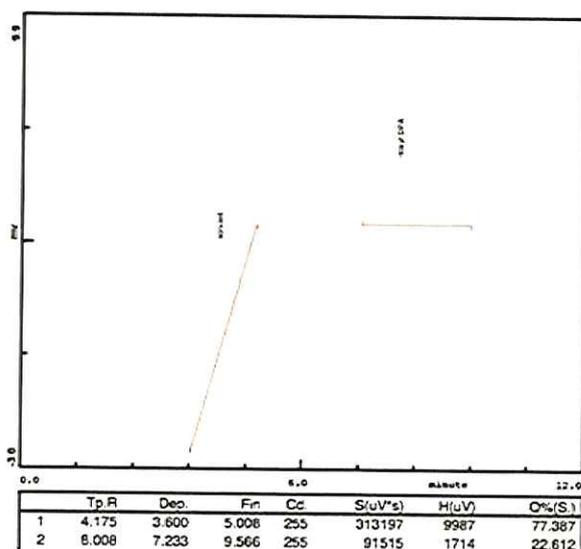


Figure 40 : Chromatogramme du tosylDPA-714 sur colonne HPLC analytique

À l'issue des 78 analyses effectuées en HPLC analytique, le t_R du tosyl-DPA a été estimé à 8.125 min avec un écart type de $0,193 \text{ min}$ et un coefficient de variation de 2.379% . Le front de solvant et le pic de tosyl-DPA sont séparés d'au moins 2 min .

III.2.1.1.2. Limite de quantification

De très faibles doses de [¹⁹F]DPA-714 et de tosyl-DPA ont été injectées dans le circuit HPLC. Un calcul du coefficient de variation (CV) de l'aire sous la courbe correspondant au pic du composé est réalisé sur chaque série (ensemble d'analyses correspondant à la même quantité injectée).

$$CV = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne}}$$

Une valeur de coefficient de variation est arbitrairement choisie (5 %) comme seuil maximal d'erreur au-delà duquel la quantification du composé n'est plus jugée suffisamment sûre. La limite de quantification correspond donc à la quantité injectée qui conduit à la valeur souhaitée de coefficient de variation (soit 5 %).

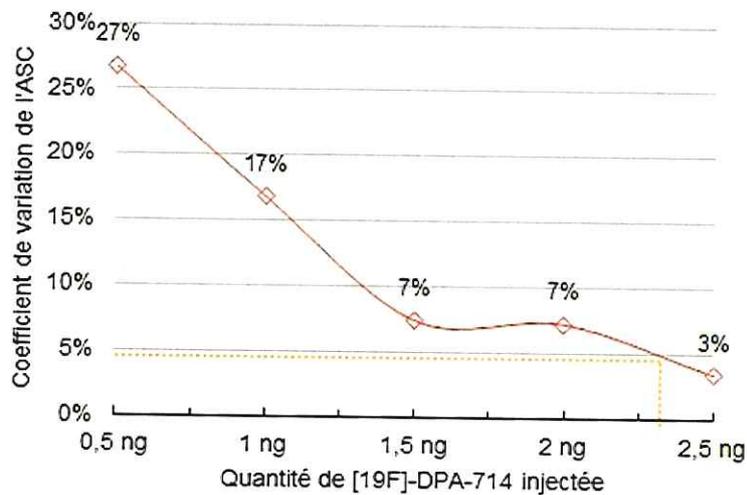


Figure 41 : Coefficient de variation de l'aire sous la courbe en fonction de la quantité de [¹⁹F]DPA-714

La limite de détection du [¹⁹F]DPA-714, déterminée graphiquement, est de 2.31 ng. Les quantités supérieures à celle-ci seront dosées avec une fiabilité supérieure à 95%.

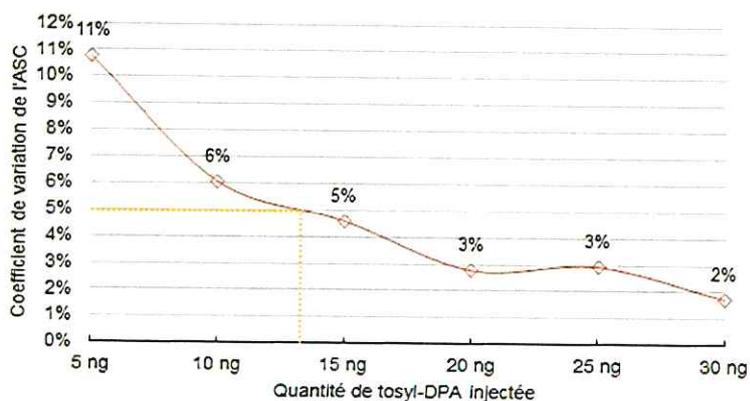


Figure 42 : Coefficient de variation de l'aire sous la courbe en fonction de la quantité de tosyl-DPA

La limite de détection du tosyl-DPA, déterminée graphiquement, est de 13.4 ng. Les quantités supérieures à celle-ci seront dosées avec une fiabilité supérieure à 95%.

Enfin, la co-injection du [^{19}F]DPA-714 et du tosyl-DPA sur la colonne analytique conduit à une bonne séparation des deux pics (> 1 min) et au maintien de leurs t_R respectifs.

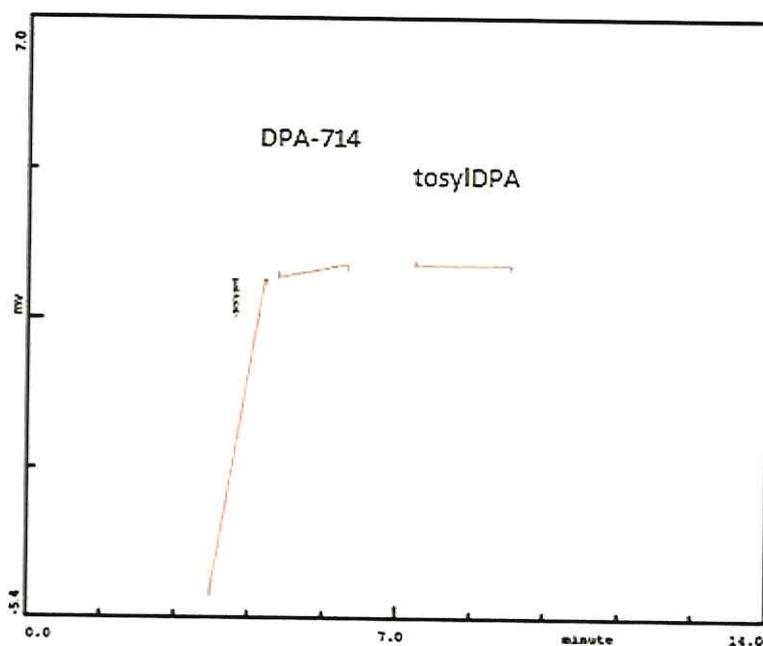


Figure 43 : Chromatogramme de co-injection du [^{19}F]DPA-714 et du tosyl-DPA

III.2.1.2 Application et interprétation des résultats

Une fois la méthode validée, l'HPLC analytique sera utilisée pour le calcul de la pureté radiochimique et chimique de la préparation. Un détecteur gamma et détecteur UV sont donc nécessaires en sortie de colonne.

Dans un premier temps, 30 μL de la préparation sont injectés dans la boucle HPLC. Le chromatogramme Gamma obtenu est le suivant :

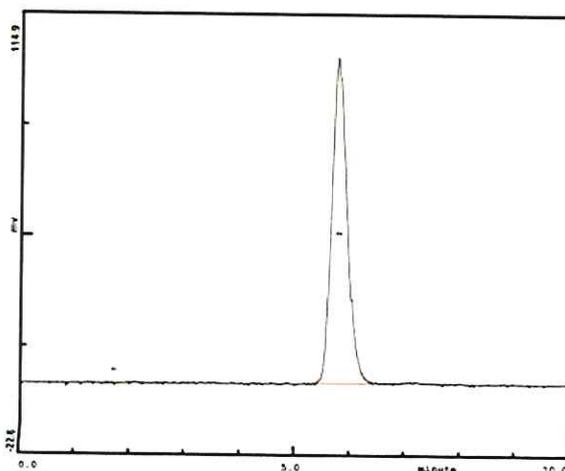


Figure 44 : Chromatogramme HPLC - Détecteur gamma



Un seul pic est observé avec un t_R d'environ 6 min, fortement évocateur de celui du [^{19}F]DPA-714. Le chromatogramme UV quant à lui ne met en valeur aucun pic, dû à une quantité injectée de [^{18}F]DPA-714 inférieure à la limite de détection.

Afin de s'assurer que le ^{18}F soit bien fixé sur le DPA-714, on procède à une co-injection de 30 μL de [^{18}F]DPA-714 avec du [^{19}F]DPA-714, puis on compare les pics et temps de rétention obtenus entre le chromatogramme Gamma et UV.

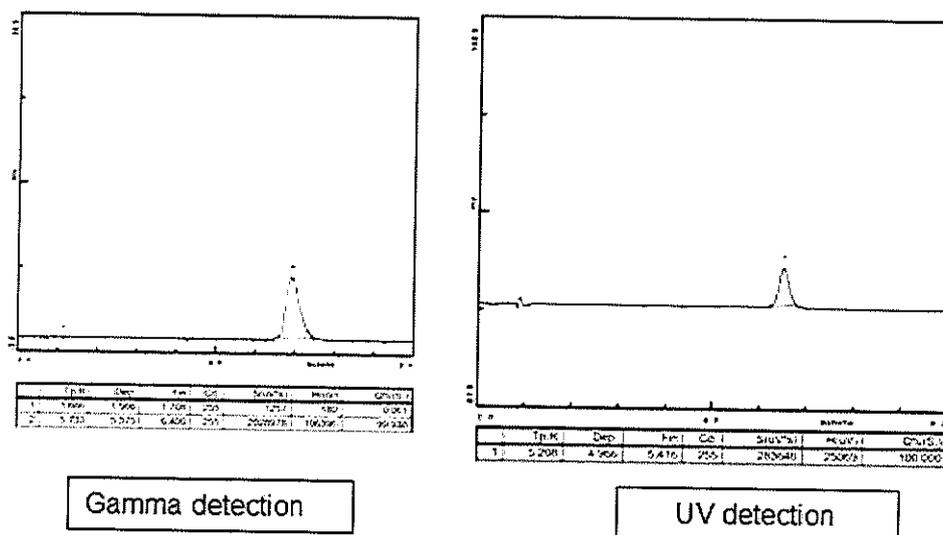


Figure 45 : Chromatogrammes gamma et UV de co-injection de [^{18}F]DPA-714 et de [^{19}F]DPA-714

Les t_R sont identiques sur les deux chromatogrammes ce qui permet d'affirmer que nous n'avons que du [^{18}F]DPA-714 dans l'échantillon (PRC \approx 100%).

III.2.2. Essais de synthèse du [^{18}F]DPA-714

De nombreuses synthèses ont été nécessaires afin de déterminer les conditions optimales à la production du [^{18}F]DPA-714 au CHU de Toulouse. La synthèse consiste uniquement en l'étape de fluoration par substitution nucléophile, le tosyl-DPA-714 étant fourni par le CHU de Tours.

III.2.2.1 Premier lot de précurseur tosylé : synthèses de septembre 2015 à juillet 2016

Les premières synthèses ont été réalisées dans l'ACN selon les conditions suivantes :

- 85°C, 10 min : 130 MBq de [^{18}F]DPA-714, rendement < 1%.
- 110°C, 10 min : 2457 MBq de [^{18}F]DPA-714, rendement de 14.3%.

L'ACN étant un solvant de classe 2, sa concentration dans le produit final ne doit pas dépasser les 410 ppm. De plus, des rendements de synthèse en moyenne plus élevés ont été trouvés dans la littérature avec le DMSO. Il s'agit d'un solvant polaire aprotique, de polarité supérieure à l'acétonitrile, permettant une meilleure solvataion des cations. Il permet ainsi d'obtenir de meilleurs rendements dans la substitution nucléophile, ce qui a incité à l'usage de ce dernier pour les synthèses suivantes.

Huit synthèses ont été effectuées dans du DMSO sur le premier lot :

- 110°C, 15 min : pas de [¹⁸F]DPA-714 synthétisé.
- 120°C, 15 min : pas de [¹⁸F]DPA-714 synthétisé.
- 130°C, 15 min :
 - o Deux synthèses ont abouti à la production de 2220 MBq et 3289 MBq avec respectivement des rendements de synthèse de 5.5 et 12.5%.
 - o Les quatre autres synthèses n'ont pas abouti. Pour deux synthèses un incident technique est survenu sur l'automate et le cyclotron. Enfin pour les deux dernières, il a été tenté de réaliser un nouveau montage de l'automate qui aurait permis la post-purification dans la hotte de synthèse, mais aucune activité n'a été retenue sur la cartouche C18 de pré-purification.

III.2.2.2 Deuxième lot de précurseur tosylé : synthèses de novembre 2016 à janvier 2017

Les synthèses effectuées à partir du deuxième lot de précurseur tosylé ont été réalisées dans du DMSO à 115°C. Ce solvant étant sensible aux produits oxydants, donc à l'air ambiant, un nouveau flacon a été utilisé pour ces synthèses.

Dans ces synthèses, différentes phases mobiles de la colonne HPLC semi-préparative ont été testées :

- Ethanol/acétate de sodium (50/50) : 1800 MBq ont pu être produits, mais lors de la réalisation du contrôle qualité une impureté a été retrouvée. Il y a donc eu une séparation insuffisante sur la colonne semi-préparative.
- Acétonitrile/acétate de sodium (35/65) : pour deux synthèses des activités de 9250 MBq et de 15725 MBq ont été retrouvées sur la cartouche C18 de pré-purification, mais aucune sur la colonne HPLC au temps de rétention (t_R) attendu (17-20 min). Un pic apparaît sur le chromatogramme aux environs de 55 min.
- Ethanol/acétate de sodium (45/55) : le t_R du [¹⁸F]DPA-714 était de 20-21 min. Cette méthode a permis de produire 1000 MBq de [¹⁸F]DPA-714 et ainsi le premier lot nécessaire à la réalisation du DME 1. Une autre synthèse a également été menée mais a échoué suite à un incident sur deux électrovannes de l'automate.

III.2.3. Procédé choisi pour la synthèse du [¹⁸F]DPA-714 au CHU de Toulouse

III.2.3.1 L'automate de fluoration Synchron R&D ®

La synthèse du [¹⁸F]DPA-714 requiert le même montage sur l'automate que celui nécessaire à la synthèse de l'AV-45, un traceur fluoré de la plaque amyloïde, spécifique de la maladie d'Alzheimer.

Le montage est constitué de :

- 5 flacons/contenants :
 - SC1 : boucle pré-remplie de 550µL du mélange K₂CO₃/Kryptofix® 2.2.2.
 - SC2 : flacon contenant le tosyl-DPA-714 dissout dans 1000 µL de DMSO.
 - SC5 : flacon contenant 2 mL d'éthanol, utilisé pour déplacer le [¹⁸F]DPA-714 dans l'étape de pré-purification.
 - SC8 : flacon contenant 5 mL d'acétonitrile, utilisé dans le séchage azéotropique.
 - SC10 : flacon contenant 10 mL d'EPPI afin de diluer le mélange réactionnel avant passage sur la C18.



- 1 réacteur en verre traité
- 1 flacon relié à la cible du cyclotron, dans lequel est transféré le ^{18}F
- 5 compteurs Geiger-Müller au niveau de :
 - la cartouche Sep Pak QMA
 - du flacon de récupération de l'eau enrichie
 - du réacteur
 - de la C18 de pré-purification
 - du flacon de recueil du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ purifié
- 20 électrovannes
- 1 sortie HPLC

Afin de garantir les conditions de synthèse optimales, la préparation de l'automate et de la hotte est contrôlée au moyen d'une « check-list » (Annexe 4).

En fin de synthèse, quels que soient les résultats obtenus, une fiche d'enregistrement de la synthèse est rédigée traçant les numéros de lots des matières premières, les étapes, les résultats ainsi que les contrôles libératoires (Annexe 5).

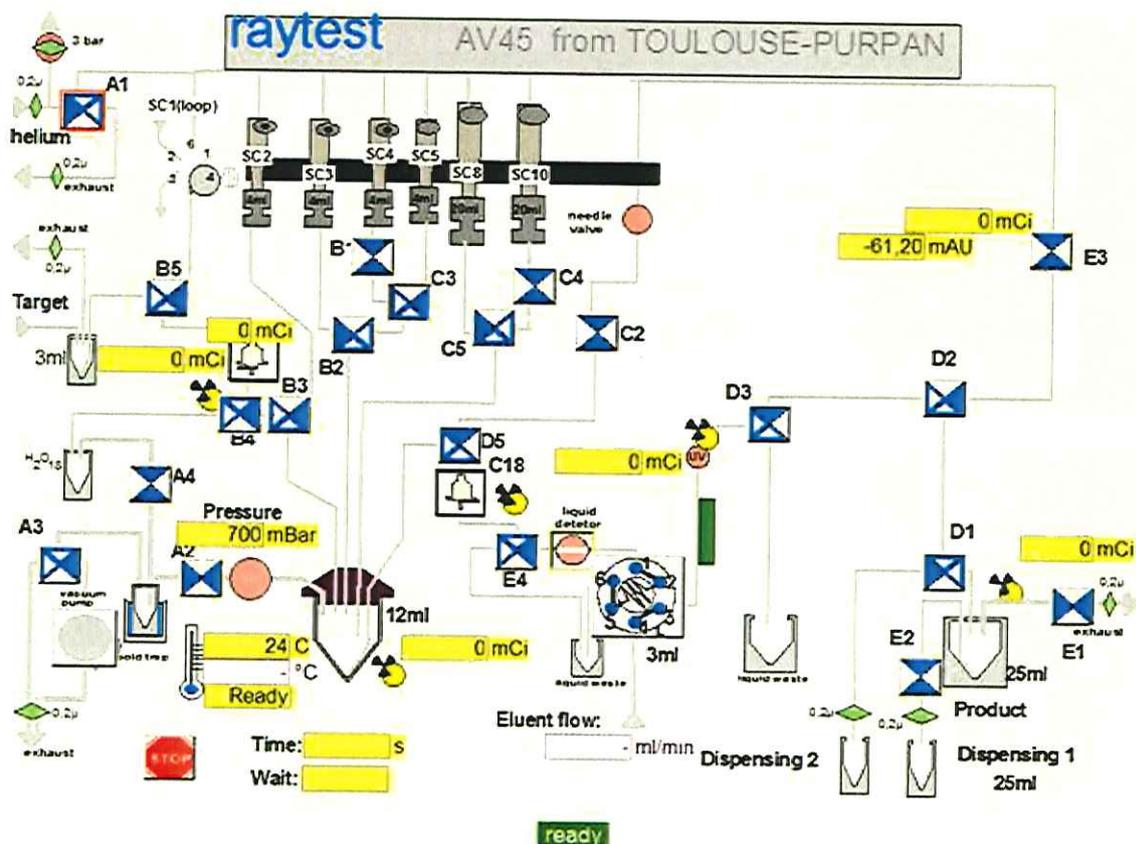


Figure 46 : Schéma de montage de l'automate pour la synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$



III.2.3.2 Le précurseur

La nomenclature chimique du tosyl-DPA-714 est : (N,N-diethyl-2-(2-(4-(2-toluènesulfonyloxyéthoxy)phényl)-5,7-diméthylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acétamide). Sa formule chimique brute est $C_{29}H_{34}N_4O_5S$ et son poids moléculaire de $550,2323 \text{ g.mol}^{-1}$.

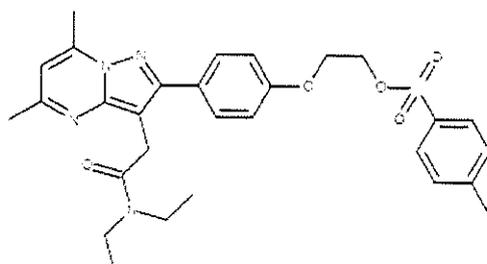


Figure 47 : Structure du (N,N-diethyl-2-(2-(4-(2-toluènesulfonyloxyéthoxy)phényl)-5,7-diméthylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acétamide)

III.2.3.3 Production du [^{18}F]Fluor

Le [^{18}F] est produit selon la réaction $^{18}\text{O} (p,n)^{18}\text{F}$. Le cyclotron IBA cyclone 10/5 accélère les protons de manière à leur conférer une énergie cinétique maximale de 10 MeV, qui bombardent la cible contenant l'eau enrichie en ^{18}O .

Pour garantir une production optimale du ^{18}F , plusieurs contrôles sont effectués :

- L'ampérage au niveau de la cheminée [$100\text{--}600 \text{ mA}$] : reflète la production de l'ion source.
- L'ampérage au niveau de la cible ($I_{ci} \approx 40 \text{ }\mu\text{A}$) : courant électrique généré par les particules accélérées sur la cible.
- L'ampérage au niveau du collimateur ($I_{co} \approx 10 \text{ à } 15 \text{ }\mu\text{A}$)
- Le rapport $R = \frac{I_{ci}}{I_{ci+1}}$ au minimum de 75%. Le calcul de ce rapport permet de vérifier que le flux de protons est idéalement orienté sur la cible. Si le rapport n'est pas satisfaisant, la position des strippers peut être modulée pour réorienter le faisceau.
- Le champ magnétique généré par les « coils ».
- La pression dans la chambre d'accélération pour évaluer le vide.

III.2.3.4 La préparation du [^{18}F]Fluor

Le $^{18}\text{F}^-$ est transféré du cyclotron à l'automate de fluoration par pression d'hélium de 3 bars. Il est ensuite séparé de l'eau enrichie dans lequel il est solubilisé, par l'intermédiaire d'une résine échangeuse d'ions (Sep Pak QMA résine-($\text{CO-NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$). L'eau enrichie peut être ainsi récupérée et stockée. Le fluor est ensuite élué de la résine par un mélange de Kryptofix® 2.2.2/bicarbonate de potassium (K_2CO_3) pour former le complexe $\text{K}[\text{F}^{18}\text{F}]\text{-Kryptofix K}_{222}$. Ce complexe permet de solubiliser le $^{18}\text{F}^-$ dans les solvants organiques et de le rendre hautement réactif.

Enfin, avant de débiter l'étape de substitution nucléophile, il est nécessaire d'éliminer toute trace d'eau du milieu réactionnel. L'eau étant nucléophile, elle pourrait diminuer les

rendements de synthèse. Pour cela, un séchage azéotropique est réalisé par 3 flashes de 0.5 mL d'acétonitrile successifs dans le réacteur, chauffé à 80-95°C pendant environ 5 min.

III.2.3.5 La substitution nucléophile

Le ^{18}F produit par le cyclotron (37 à 55 GBq) réagit avec 2 mg de tosyl-DPA-714 dans 1 mL de DMSO à 115°C pendant 15 minutes sans agitation selon la réaction suivante :

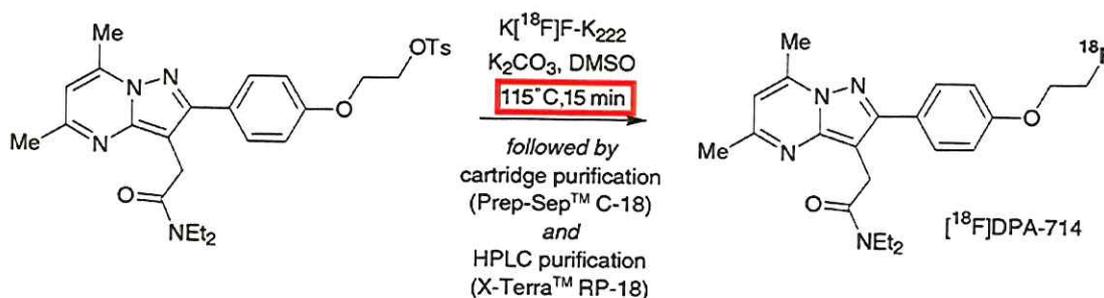


Figure 48 : Procédé de synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ au CHU de Toulouse

III.2.3.6 Pré-purification

L'ensemble des réactifs est ensuite dilué avec 10 mL d'eau purifiée et passé sur une cartouche SPE type C18. Le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ étant lipophile, il sera retenu par la C18. La cartouche est ensuite asséchée par un flux d'hélium, puis éluee par 2 mL d'éthanol pur, qui seront injectés dans la boucle HPLC pour purification.

III.2.3.7 Purification du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$

Afin d'isoler le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$, l'éluat de la C18 est injecté dans le système HPLC (chromatographie semi-préparative). La phase solide est une colonne Luna Phenomenex® C18, de dimension 250 × 10 mm, constituée de particules de 10 µm, dont les pores sont de 100Å. La phase mobile est un mélange éthanol / acétate de sodium 0.1M (45/55) ayant un débit de 2 mL/min. Le système est couplé en sortie de colonne à un détecteur UV et un détecteur gamma. Dans ces conditions, le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ a une temps de rétention (t_R) de 21 min (cf. figure 31).

III.2.3.8 Post-purification et concentration

À l'apparition du pic de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$, la phase mobile est envoyée dans un flacon contenant 100 mL d'eau stérile. Le contenu du flacon est ensuite transféré dans une hotte blindée de classe A, où il subira l'étape de concentration, similaire à l'étape de pré-purification, grâce à une cartouche SPE C18. Le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ sera ensuite élué avec 1 mL d'éthanol. Cette solution sera stérilisée par filtration stérilisante via un filtre de 0.22 µm et transférée dans un flacon Elumatic® contenant 9 mL de chlorure de sodium 0.9%.

III.2.4. Description des synthèses nécessaires à l'élaboration du DME 1

Pour élaborer le dossier du médicament expérimental relatif à la qualité pharmaceutique et chimique, il a fallu réaliser trois lots de production.

III.2.4.1 Lot n°1

Ce lot a été réalisé le 30/12/2016. L'automate a été préparé selon les conditions ci-dessous.

Tableau 6 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°1 de [¹⁸F]DPA-714

Vial	Réactifs	Volume / [C]	Origine, numéro de lot
SC1	Kryptofix	550 µL	ABX, TM-ES-160104001-1 exp 01/2017
SC2	Précurseur DPA	1.5 mg	TAR009-10-06-15
SC2	DMSO	1000 µL	Sigma Aldrich, STVG3385V
SC5	Ethanol	2 mL	VWR CHEMICALS, lot n°14I260505 exp 09/19
SC8	Acétonitrile	5 mL	ABX, lot n°TM-A-151102001-1 exp : 11/17
SC10	EPPI	10 mL	Baxter, lot n°15I14BA1B exp : 08/18

La synthèse a donné les résultats suivants :

Tableau 7 : Résultats de la synthèse du lot n°1

Activité transférée	30 mCi
Volume transféré	1 mL de solution mère éthanolique
Rendement de synthèse (EOS)	2.75%
Volume prélevé	1 mL dans 9 ml de NaCl 0.9%
Titre massique [¹⁸ F]DPA-714	1.24 µg/mL
Activité spécifique	35 GBq/µmol
Lot DPA-714	161230
Lot NaCl 0.9 %	PROAMP : 1601724 exp : 03/19

Ci-dessous les contrôles libératoires effectués sur le lot 1 et leurs résultats :

- Limpidité : conforme.
- pH [5-8] : 5, conforme.
- PRC (> 95%) : 99.938% conforme.
- PRN : T_{1/2} = 109.58 min [105-115] conforme.
- Spot Test Kryptofix : inférieur à la limite de spécification, conforme.
- Ethanol (< 10%) : 46.9 g/L soit 4.69%, conforme.
- Acétone (≤ 5000 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- DMSO (≤ 5000 ppm) : < 100 ppm, conforme
- Acétonitrile (≤ 410 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- Intégrité des filtres par test du point de bulle (≥ 3.45 bars), conforme.
- Activité volumique à l'heure de calibration (> 54 MBq/mL) : 111 MBq/mL.

Ci-dessous les contrôles différés :

- Endotoxines : 0.0065 UI/mL < 17.5 UI/mL.
- Stérilité : conforme.



III.2.4.2 Lot n°2

Ce lot a été réalisé le 26/01/2017. L'automate a été préparé selon les conditions ci-dessous.

Tableau 8 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°2 de [¹⁸F]DPA-714

Vial	Réactifs	Volume / [C]	Origine, numéro de lot
SC1	Kryptofix	550 µL	ABX, TM-ES-160104001-1 exp 01/2017
SC2	Précurseur DPA	2.1 mg	TAR009-10-06-15
SC2	DMSO	1000 µL	Sigma Aldrich, STVG3385V
SC5	Ethanol	2 mL	VWR CHEMICALS, lot n°14I260505 exp 09/19
SC8	Acétonitrile	5 mL	ABX, lot n°TM-A-151102001-1 exp : 11/17
SC10	EPPI	10 mL	Baxter, lot n°15I14BA1B exp : 08/18

La synthèse a donné les résultats suivants :

Tableau 9 : Résultats de la synthèse du lot n°2

Activité transférée	32 mCi
Volume transféré	1.2 mL de solution mère éthanolique
Rendement de synthèse (EOS)	4 %
Volume prélevé	1 mL dans 9 ml de NaCl 0.9%
Titre massique [¹⁸ F]DPA-714	1.3 µg/mL
Activité spécifique	34.7 GBq/µmol
Lot DPA-714	170126
Lot NaCl 0.9 %	PROAMP : 1601724 exp : 03/19

Ci-dessous les contrôles libératoires effectués sur le lot 1 et leurs résultats :

- Limpidité : conforme.
- pH [5-8] : 5, conforme.
- PRC (> 95%) : 99.929% conforme.
- PRN : T_{1/2} = 110.6 min [105-115] conforme.
- Spot Test Kryptofix : inférieur à la limite de spécification, conforme.
- Ethanol (< 10%) : 41.5 g/L soit 4.15%, conforme.
- Acétone (≤ 5000 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- DMSO (≤ 5000 ppm) : < 100 ppm, conforme
- Acétonitrile (≤ 410 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- Intégrité des filtres par test du point de bulle (≥ 3.45 bars), conforme.
- Activité volumique à l'heure de calibration (> 54 MBq/mL) : 118 MBq/mL.

Ci-dessous les contrôles différés :

- Endotoxines : 0.005 UI/mL < 17.5 UI/mL.
- Stérilité : conforme.



III.2.4.3 Lot n°3

Ce lot a été réalisé le 31/01/2017. L'automate a été préparé selon les conditions ci-dessous.

Tableau 10 : Préparation de l'automate – Synthèse du lot n°3 de [18F]DPA-714

Vial	Réactifs	Volume / [C]	Origine, numéro de lot
SC1	Kryptofix	550 µL	ABX, TM-ES-160104001-1 exp 01/2017
SC2	Précurseur DPA	2.1 mg	TAR009-10-06-15
SC2	DMSO	1000 µL	Sigma Aldrich, STVG3385V
SC5	Ethanol	2 mL	VWR CHEMICALS, lot n°14I260505 exp 09/19
SC8	Acétonitrile	5 mL	ABX, lot n°TM-A-151102001-1 exp : 11/17
SC10	EPPI	10 mL	Baxter, lot n°15I14BA1B exp : 08/18

La synthèse a donné les résultats suivants :

Tableau 11 : Résultats de la synthèse du lot n°3

Activité transférée	70.5 mCi
Volume transféré	1 mL de solution mère éthanolique
Rendement de synthèse (EOS)	7.97 %
Volume prélevé	1 mL dans 9 ml de NaCl 0.9%
Titre massique [18F]DPA-714	1.2 µg/mL
Activité spécifique	84.2 GBq/µmol
Lot DPA-714	170131
Lot NaCl 0.9 %	PROAMP : 1601724 exp : 03/19

Ci-dessous les contrôles libératoires effectués sur le lot 1 et leurs résultats :

- Limpidité : conforme.
- pH [5-8] : 5, conforme.
- PRC (> 95%) : 99.995% conforme.
- PRN : T_{1/2} = 109.07 min [105-115] conforme.
- Spot Test Kryptofix : inférieur à la limite de spécification, conforme.
- Ethanol (< 10%) : 65.3 g/L soit 6.53%, conforme.
- Acétone (≤ 5000 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- DMSO (≤ 5000 ppm) : < 100 ppm, conforme
- Acétonitrile (≤ 410 ppm) : < 0.5 ppm, conforme.
- Intégrité des filtres par test du point de bulle (≥ 3.45 bars), conforme.
- Activité volumique à l'heure de calibration (> 54 MBq/mL) : 259 MBq/mL.

Ci-dessous les contrôles différés :

- Endotoxines : 0.05 UI/mL < 17.5 UI/mL.
- Stérilité : conforme.



III.3. Discussion

III.3.1. Rendements

Parmi les synthèses réalisées sur la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse, on constate que les rendements de synthèses sont en général très inférieurs à ceux recensés dans la littérature, notamment par rapport à Damont.

Ce sont d'ailleurs les résultats de cette publication qui ont orienté le choix des conditions de synthèse.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces rendements faibles :

- Tout d'abord la chimie de fluoration est une chimie de « trace » qui ne permet pas l'obtention de rendements de synthèse élevés ; en effet une activité en ^{18}F de 1 Ci soit 37 GBq représente une quantité de matière infime de ^{18}F d'environ 5.10^{-10}mol . La quantité de tosyl-DPA utilisée est, quant à elle, de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} mol, ce qui fait du ^{18}F le facteur fortement limitant de la réaction. La moindre impureté peut ainsi diminuer de manière considérable voire empêcher la substitution nucléophile.
- **L'activité initiale en ^{18}F** : plus elle est importante, plus les chances de marquer le précurseur sont élevées. Cependant les rendements de ce type de synthèse sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rdt} = \frac{\text{Activité } [^{18}\text{F}]\text{DPA714}}{\text{Activité } [^{18}\text{F}]\text{initiale}}$$

L'activité initiale étant au dénominateur, plus elle sera élevée plus le rendement sera diminué.

- **La quantité initiale de précurseur tosyl-DPA** : plus la quantité est grande, plus les sites potentiels d'attaque par le ^{18}F sont disponibles pour la substitution nucléophile. Dans les items précédents, nous avons vu que de nombreuses synthèses ont été nécessaires avant d'obtenir les trois lots conformes. Le précurseur étant fourni par le CHU de Tours et afin de réaliser le maximum de synthèses, la quantité de précurseur utilisée en moyenne par synthèse était de 2.2 mg, soit 2 à 2.5 fois plus que les quantités utilisées par Damont.
- **La température du milieu réactionnel** : lors de la réalisation des lots, la température utilisée pour la substitution nucléophile était de 115°C . Dans le cas de Damont, la température de synthèse était de 165°C avec des rendements corrigés obtenus de l'ordre de 30%, mais avec des quantités de précurseurs de l'ordre de 5 mg. Les autres publications (James, Doorduïn et Arlicot) relatent des températures de synthèses de 85 et 100°C , avec des quantités de précurseur similaires à celles utilisées à Toulouse mais avec des rendements globalement supérieurs. On peut constater qu'à des températures inférieures à celles employées chez Damont en épargnant du précurseur, on obtient des rendements intéressants, qui laissent suggérer que la température n'est pas le facteur clé de la synthèse, a contrario du solvant.



- **Les volumes réactionnels** : dans notre cas le tosyl-DPA est dissous dans 1 mL de DMSO. Pour les autres synthèses de la littérature le précurseur était dissous dans :
 - o 0.6 mL de DMSO pour Damont.
 - o 0.5 mL de DMF pour Doorduïn.
 - o 3 mL d'ACN pour James et Arlicot.

Damont utilisant des quantités de précurseur supérieures pour un volume de dissolution inférieur, la concentration en tosyl-DPA du milieu réactionnel était 3 à 4 fois supérieure à celle de Toulouse.

Plus les concentrations en réactifs sont élevées plus les probabilités d'interactions, ici entre le tosyl-DPA et le $^{18}\text{F}^-$ nucléophile, sont fortes, ce qui peut expliquer des rendements supérieurs pour Damont.

- **Le séchage azéotropique** : l'étape indispensable à l'élimination des dernières traces d'eau (nucléophile) qui pourrait entrer en compétition avec le $^{18}\text{F}^-$ au niveau du groupement tosylate (nucléofuge). Les conditions de séchage dans la littérature sont les suivantes :
 - o Damont : sous flux d'azote, chauffé à 145-150°C pendant 10 min.
 - o James : par 3 ajouts successifs de 80 μL d'ACN, à 95°C, sous flux d'azote et vide.
 - o Doorduïn : dans de l'ACN à 130°C.

À Toulouse le séchage est réalisé grâce à 3 ajouts successifs d'ACN (environ 1.5 mL), à 85-95°C, avec alternance d'injections d'hélium puis de vides.

Tableau 12 : Récapitulatif des synthèses du ^{18}F DPA-714

Synthèse	Tosyl-DPA (mg)	T (°C)	t_R (min)	Solvant	Rendement C (%)	Activité spécifique (GBq/ μmol)
James (2008)	2,5	85	10	ACN	8	-
	≥ 6	85	10	ACN	21	-
Doorduïn (2009)	1	100	10	DMF	9-25	80 ± 35
Damont (2008)	4,5-5,0	165	5	DMSO	26-35	74 ± 37
Arlicot (2012)	2,0-2,5	85	10	ACN	12-20	83 ± 37
Lot 1	1,5	115	15	DMSO	2,8	35
Lot 2	2,1	115	15	DMSO	4	34.7
Lot 3	2,1	115	15	DMSO	8	84.2

T = température, t_R = durée, C = corrigé de la décroissance

III.3.2. Activités spécifiques

Malgré des rendements de synthèse assez bas, on peut quand même observer des activités spécifiques obtenues similaires à celles décrites par Arlicot, Damont ou Doorduïn.

III.3.3. Purification sur HPLC Semi-Préparative

Contrairement aux auteurs précédemment cités qui utilisent systématiquement l'acétonitrile dans la phase mobile associé à l'acétate d'ammonium ou le dihydrogénophosphate de sodium, il a été décidé d'utiliser comme phase mobile au CHU de Toulouse l'éthanol et l'acétate de sodium (45/55).

En effet lors des essais de synthèses, associé à l'acétate de sodium, l'acétonitrile n'a pas permis d'isoler le [¹⁸F]DPA-714 sur la colonne semi-préparative C18.

Tableau 13 : Récapitulatif des purifications

	Colonne HPLC Semi-Préparative C18	Phase mobile	Débit (mL/min)	t _R [¹⁸ F]DPA- 714 (min)	t _R tosyl- DPA (min)
Damont	X-Terra RP18 Dimensions : 300*7,8 mm Taille particules : 7 µm	NH ₄ OAc (pH 10)/CH ₃ CN proportions : 60/40 (v/v)	5	10-11	>30
James	X-Terra RP18 Dimensions : 300*7,8 mm Taille particules : 10 µm	NH ₄ OAc (pH 10)/CH ₃ CN proportions : 60/40 (v/v)	4	12	35
Doorduyn	SymmetryPrep Dimensions : 300*7,8 mm Taille particules : 7 µm	CH ₃ CN/NaH ₂ PO ₄ proportions : 45/55 (v/v)	5	11	-
Toulouse	Luna Phenomenex Dimensions : 250*10 mm Taille particules : 5 µm	Ethanol/Acétate Na proportions : 45/55 (v/v)	2	20-21	> 50

t_R : temps de rétention, NH₄OAc : acétate d'ammonium, CH₃CN : acétonitrile, NaH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de sodium

III.3.4. Utilisation du [¹⁸F]DPA-714 dans la RIPH

La synthèse du [¹⁸F]DPA-714 a été motivée par la mise en place de plusieurs protocoles de RIPH que nous allons décrire brièvement ci-dessous.

III.3.4.1 NICAD

Le protocole NICAD : « Neuro-Inflammation et déclin cognitif dans la maladie d'Alzheimer », est une étude multi-centrique coordonnée par le CHU de Tours.

L'objectif principal est de quantifier la neuro-inflammation cérébrale, mesurée par la fixation et la distribution du radiotracer [¹⁸F]DPA-714 via le TSPO en imagerie TEP, chez des patients atteints de MA, et de visualiser ses liens avec la vitesse de déclin cognitif.

Plus précisément le but est d'évaluer le rôle de la neuro-inflammation selon les stades de la MA ainsi que dans le vieillissement.

Dans cet essai : deux traceurs TEP seront utilisés :

- Le [¹⁸F]DPA-714 permettant la quantification de la neuro-inflammation et de l'activation microgliale, qui sera synthétisé au niveau de la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse.

- Le [¹⁸F]AV-45 ou florbetapir, un traceur de la plaque β-amyloïde permettant de quantifier la charge amyloïde, commercialisé sous la spécialité AMYVID® par les laboratoires AVID / Lilly.

L'apparition de la plaque amyloïde est très précoce dans la MA, bien avant l'apparition des symptômes cliniques. Cependant cette charge amyloïde n'évolue pas ou peu au cours du temps, ce qui fait que le traceur AV-45 ne peut être utilisé dans le suivi de la MA.

Le FDG et l'IRM semblent être plus exacts pour suivre la progression de la maladie, bien que l'apparition des premiers signes cliniques soient encore retardés (Jack et Holtzman 2013).

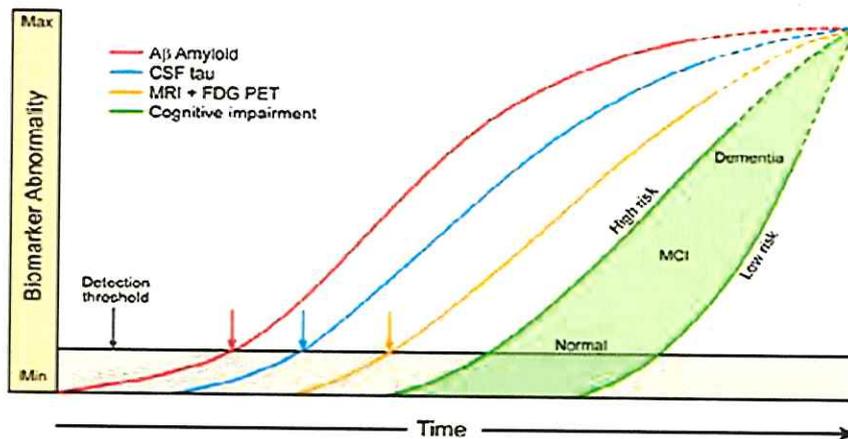


Figure 49 : Cinétique des biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer (Jack et Holtzman 2013)

Ainsi ce protocole peut déterminer si la neuro-inflammation a sa place en tant que nouveau marqueur dans la neuro-inflammation.

III.3.4.2 VIP

Le protocole VIP est une étude dont le but est de visualiser, par imagerie TEP via le [¹⁸F]DPA-714, les effets du VX-745 ou neflamapimod sur la neuro-inflammation chez des patients atteints de MA à un stade précoce (MMSE > 20).

La littérature scientifique à ce jour relate d'un côté des effets délétères de la neuro-inflammation sur la MA, avec une augmentation de la charge amyloïde, et de l'autre une corrélation entre scores cognitifs et neuro-inflammation régionale.

La neuro-inflammation semble donc fortement impliqué dans la physiopathologie de la MA et peut être une cible thérapeutique d'intérêt, particulièrement dans les stades précoces de la maladie.

La molécule anti-inflammatoire testée, le VX-745, est un inhibiteur spécifique de la protéine intracellulaire p38 MAPKα, qui joue un rôle clé dans la toxicité synaptique induite par l'inflammation.

Il s'agit d'un essai piloté par le CHU de Toulouse, qui sera réalisé en double-aveugle (VX-475 vs. placebo) sur une vingtaine de patients, et dont l'efficacité du traitement sera monitoré par TEP grâce au [¹⁸F]DPA-714.

III.3.4.3 Coma3D

Le protocole Coma3D, utilisant le [¹⁸F]DPA-714, va être mis en place au CHU de Toulouse pour évaluer les connexions cérébrales structurelles (par IRM), fonctionnelles (par IRMf) et métaboliques (par TEP) des patients dans le coma. Cibler la microglie via le TSPO chez les patients comateux, permettrait d'évaluer leur potentiel de récupération neurologique. Actuellement les données cliniques ne permettent pas de distinguer, à la phase aiguë, les patients qui pourront récupérer de ceux qui évolueront vers un état chronique.

Coma3D est une étude prospective, descriptive monocentrique, qui inclura :

- 18 patients adultes dans un état de coma d'origine traumatique ou anoxique, à la phase initiale du coma, c'est-à-dire dans le premier mois post-lésionnel, qui constitueront le groupe patient.
- 12 volontaires sains appariés en âge et en genre au groupe patients, qui constitueront le groupe témoin.

III.3.4.4 InflaDep

InflaDep est un projet mené par l'équipe de psychiatrie du CHU de Toulouse dont le but est de déterminer l'implication de la neuro-inflammation dans l'EDC résistant. Il s'agit d'une étude comparative transversale de trois groupes de sujets, constitués chacun de 20 patients :

- Le groupe expérimental : 20 patients présentant un EDC d'intensité modérée à sévère traités par antidépresseurs considérés comme inefficaces.
- Le groupe contrôle pathologique : 20 patients ayant présenté un EDC d'intensité modérée à sévère, encore traités par antidépresseurs et étant en rémission depuis au moins 8 semaines.
- Le groupe contrôle : 20 volontaires sains non-déprimés.

Ces trois groupes seront appariés en âge et en genre.

Le monitoring de la neuro-inflammation sera réalisé par imagerie TEP grâce au [¹⁸F]DPA-714.

À ce jour les traitements antidépresseurs seraient inactifs chez 30 à 40% des patients. Si le lien entre neuro-inflammation et EDC résistant avait à être confirmé, la thérapie anti-inflammatoire pourrait ouvrir des perspectives intéressantes dans le traitement de la dépression.

Nota : pour l'ensemble des protocoles cités ci-dessus, les différences d'affinité du [¹⁸F]DPA-714 pour le TSPO dues au polymorphisme génétique *rs6971*, ne peuvent constituer un facteur d'exclusion. L'interprétation des résultats devra être pondérée par le phénotype de chaque patient.

Conclusion

Plusieurs essais de synthèses, 16 au total, ont été nécessaires à l'obtention des 3 lots de validation du processus et à la rédaction du DME. Ces lots ainsi que le processus ont reçu l'approbation de l'ANSM qui a validé l'utilisation chez l'Homme du [^{18}F]DPA-714 synthétisé au niveau de la plateforme de fluoration.

L'imagerie moléculaire pour l'exploration de la neuro-inflammation a atteint le stade de l'application clinique grâce à l'identification d'une cible moléculaire adaptée et d'un MRPE spécifique de cette cible.

Actuellement, quatre protocoles de RIPH utilisant le [^{18}F]DPA-714 sont en attente de mise en place au CHU de Toulouse, ce qui constitue un enjeu de production majeur pour la plateforme de fluoration.

De plus, le CHU de Toulouse étant le promoteur de certains protocoles, la plateforme de fluoration fournira le MRPE pour d'autres centres hospitaliers tels que le CHU de Montpellier. Ces envois nécessiteront donc des activités volumiques élevées afin de garantir aux patients des doses conformes, impliquant une amélioration de la reproductibilité des synthèses ainsi que des rendements.

Parmi les axes d'amélioration potentiels, l'augmentation des quantités de réactifs (tosyl-DPA ou ^{18}F) dans le milieu réactionnel a été évoquée.

Dans ce contexte de livraison, une autorisation de transport devra être demandée auprès de l'ASN de type ADR (classe 7), pour le transport de marchandises radioactives par la route.

Actuellement la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse a une autorisation de production de ^{18}F limitée à 55.5 GBq par tir. Si de plus grandes activités de ^{18}F devaient être utilisées, une modification de l'autorisation ASN serait nécessaire.

Références bibliographiques

- Agnello, D., L. Carvelli, V. Muzio, P. Villa, B. Bottazzi, N. Polentarutti, T. Mennini, A. Mantovani, et P. Ghezzi. 2000. « Increased Peripheral Benzodiazepine Binding Sites and Pentraxin 3 Expression in the Spinal Cord during EAE: Relation to Inflammatory Cytokines and Modulation by Dexamethasone and Rolipram ». *Journal of Neuroimmunology* 109 (2): 105-11.
- Arlicot, Nicolas, Johnny Vercouillie, Maria-João Ribeiro, Clovis Tauber, Yann Venel, Jean-Louis Baulieu, Serge Maia, et al. 2012. « Initial Evaluation in Healthy Humans of [18F]DPA-714, a Potential PET Biomarker for Neuroinflammation ». *Nuclear Medicine and Biology* 39 (4): 570-78. doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.10.012.
- Aurengo, André. s. d. « Couronne de détection TEP ». http://www.laradioactivite.com/site/pages/TEP_Principe.htm
- Auvity, Sylvain, Wadad Saba, Sébastien Goutal, Claire Leroy, Irène Buvat, Jérôme Cayla, Fabien Caillé, Michel Bottlaender, Salvatore Cisternino, et Nicolas Tournier. 2017. « Acute Morphine Exposure Increases the Brain Distribution of [18F]DPA-714, a PET Biomarker of Glial Activation in Nonhuman Primates ». *International Journal of Neuropsychopharmacology* 20 (1): 67-71. doi:10.1093/ijnp/pyw077.
- Bordet, T., B. Buisson, M. Michaud, J. L. Abitbol, F. Marchand, J. Grist, E. Andriambelason, Marzia Malcangio, et R. M. Pruss. 2008. « Specific Antinociceptive Activity of Cholest-4-En-3-One, Oxime (TRO19622) in Experimental Models of Painful Diabetic and Chemotherapy-Induced Neuropathy ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (2). doi:10.1124/jpet.108.139410.
- Bordet, Thierry, Bruno Buisson, Magali Michaud, Cyrille Drouot, Pascale Galéa, Pierre Delaage, Natalia P. Akentieva, et al. 2007. « Identification and Characterization of Cholest-4-En-3-One, Oxime (TRO19622), a Novel Drug Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322 (2): 709-20. doi:10.1124/jpet.107.123000.
- Casellas, Pierre, Sylvaine Galiege, et Anthony S. Basile. 2002. « Peripheral Benzodiazepine Receptors and Mitochondrial Function ». *Neurochemistry International* 40 (6): 475-86.
- Chen, Ming-Kai, Kwamena Baidoo, Tatyana Verina, et Tomás R. Guilarte. 2004. « Peripheral Benzodiazepine Receptor Imaging in CNS Demyelination: Functional Implications of Anatomical and Cellular Localization ». *Brain: A Journal of Neurology* 127 (Pt 6): 1379-92. doi:10.1093/brain/awh161.
- Code de la santé publique - Article L1121-1*. 2017. *Code de la santé publique*. Vol. L1121-1. Consulté le mai 18.
- Code de la santé publique - Article L1121-2*. 2017. *Code de la santé publique*. Vol. L1121-2. Consulté le mai 18.
- Code de la santé publique - Article L1333-4*. s. d. *Code de la santé publique*. Vol. L1333-4.
- Code de la santé publique - Article R1333-17*. s. d. *Code de la santé publique*. Vol. R1333-17.
- Code de la santé publique - Article R5126-9*. 2017. *Code de la santé publique*. Vol. R5126-9. Consulté le mai 17.
- Code de la santé publique - Article R5126-16*. 2017. *Code de la santé publique*. Vol. R5126-16. Consulté le mai 17.
- Costa, Barbara, Stefano Pini, Pamela Gabelloni, Eleonora Da Pozzo, Marianna Abelli, Lisa Lari, Matteo Preve, Antonio Lucacchini, Giovanni B. Cassano, et Claudia Martini. 2009. « The Spontaneous Ala147Thr Amino Acid Substitution within the Translocator Protein

- Influences Pregnenolone Production in Lymphomonocytes of Healthy Individuals ». *Endocrinology* 150 (12): 5438-45. doi:10.1210/en.2009-0752.
- Costa, Barbara, Stefano Pini, Claudia Martini, Marianna Abelli, Pamela Gabelloni, Stefano Landi, Matteo Muti, et al. 2009. « Ala147Thr Substitution in Translocator Protein Is Associated with Adult Separation Anxiety in Patients with Depression ». *Psychiatric Genetics* 19 (2): 110-11. doi:10.1097/YPG.0b013e32832080f6.
- Damont, Annelaure, Françoise Hinnen, Bertrand Kuhnast, Marie-Anne Schöllhorn-Peyronneau, Michelle James, Christopher Luus, Bertrand Tavitian, Michael Kassiou, et Frédéric Dollé. 2008. « Radiosynthesis of [18F]DPA-714, a Selective Radioligand for Imaging the Translocator Protein (18 KDa) with PET ». *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 51 (7): 286-92. doi:10.1002/jlcr.1523.
- Delavoie, Franck, Hua Li, Matthew Hardwick, Jean-Claude Robert, Christoforos Giatzakis, Gabriel Péranzi, Zhi-Xing Yao, Jean Maccario, Jean-Jacques Lacapère, et Vassilios Papadopoulos. 2003. « In Vivo and in Vitro Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Polymerization: Functional Significance in Drug Ligand and Cholesterol Binding ». *Biochemistry* 42 (15): 4506-19. doi:10.1021/bi0267487.
- Dessaud, E., C. André, B. Scherrer, P. Berna, R. Pruss, V. Cuvier, W. Hauke, et al. 2014. « Results of a Phase II Study to Assess Safety and Efficacy of Olesoxime (TRO19622) in 3-25 Years Old Spinal Muscular Atrophy Patients ». *Neuromuscular Disorders* 24 (9): 920-21. doi:10.1016/j.nmd.2014.06.418.
- Disselhorst, Jonathan A., Maarten Brom, Peter Laverman, Cornelius H. Slump, Otto C. Boerman, Wim J. G. Oyen, Martin Gotthardt, et Eric P. Visser. 2010. « Image-Quality Assessment for Several Positron Emitters Using the NEMA NU 4-2008 Standards in the Siemens Inveon Small-Animal PET Scanner ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 51 (4): 610-17. doi:10.2967/jnumed.109.068858.
- Doorduyn, Janine, Hans C. Klein, Rudi A. Dierckx, Michelle James, Michael Kassiou, et Erik F. J. de Vries. 2009. « [11C]-DPA-713 and [18F]-DPA-714 as New PET Tracers for TSPO: A Comparison with [11C]-(R)-PK11195 in a Rat Model of Herpes Encephalitis ». *Molecular Imaging and Biology* 11 (6): 386-98. doi:10.1007/s11307-009-0211-6.
- « Dossier de médicament expérimental: données cliniques (DME 3) ». 2016. Service de Médecine Nucléaire / Radiopharmacie-PUI-CERRP / Unité INSERM 930 / CHU de Tours.
- Fan, Jinjiang, Malena B. Rone, et Vassilios Papadopoulos. 2009. « Translocator Protein 2 Is Involved in Cholesterol Redistribution during Erythropoiesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (44): 30484-97. doi:10.1074/jbc.M109.029876.
- Galiègue, Sylvaine, Omar Jbilo, Thérèse Combes, Estelle Bribes, Pierre Carayon, Gérard Le Fur, et Pierre Casellas. 1999. « Cloning and Characterization of PRAX-1 A NEW PROTEIN THAT SPECIFICALLY INTERACTS WITH THE PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (5): 2938-52. doi:10.1074/jbc.274.5.2938.
- Gatliff, J., et M. Campanella. 2012. « The 18 KDa Translocator Protein (TSPO): A New Perspective in Mitochondrial Biology ». *Current Molecular Medicine* 12 (4): 356-68.
- Girard, Christelle, Song Liu, Françoise Cadepond, David Adams, Catherine Lacroix, Marc Verleye, Jean-Marie Gillardin, Etienne-Emile Baulieu, Michael Schumacher, et Ghislaine Schweizer-Groyer. 2008. « Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (51): 20505-10. doi:10.1073/pnas.0811201106.

- Hamelin, Lorraine, Julien Lagarde, Guillaume Dorothée, Claire Leroy, Mickael Labit, Robert A. Comley, Leonardo Cruz de Souza, et al. 2016. « Early and Protective Microglial Activation in Alzheimer's Disease: A Prospective Study Using ¹⁸F-DPA-714 PET Imaging ». *Brain* 139 (4): 1252-64. doi:10.1093/brain/aww017.
- Hanisch, Uwe-Karsten, et Helmut Kettenmann. 2007. « Microglia: Active Sensor and Versatile Effector Cells in the Normal and Pathologic Brain ». *Nature Neuroscience* 10 (11): 1387-94. doi:10.1038/nn1997.
- Hirsch, J. D., C. F. Beyer, L. Malkowitz, B. Beer, et A. J. Blume. 1989. « Mitochondrial Benzodiazepine Receptors Mediate Inhibition of Mitochondrial Respiratory Control ». *Molecular Pharmacology* 35 (1): 157-63.
- Jack, Clifford R., et David M. Holtzman. 2013. « Biomarker Modeling of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 80 (6): 1347-58. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.003.
- James, Michelle L., Roger R. Fulton, Johnny Vercoillie, David J. Henderson, Lucette Garreau, Sylvie Chalon, Frederic Dolle, Silvia Selleri, Denis Guilloteau, et Michael Kassiou. 2008. « DPA-714, a New Translocator Protein-Specific Ligand: Synthesis, Radiofluorination, and Pharmacologic Characterization ». *Journal of Nuclear Medicine* 49 (5): 814-22. doi:10.2967/jnumed.107.046151.
- Ji, Bin, Jun Maeda, Makoto Sawada, Maiko Ono, Takashi Okauchi, Motoki Inaji, Ming-Rong Zhang, et al. 2008. « Imaging of Peripheral Benzodiazepine Receptor Expression as Biomarkers of Detrimental versus Beneficial Glial Responses in Mouse Models of Alzheimer's and Other CNS Pathologies ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (47): 12255-67. doi:10.1523/JNEUROSCI.2312-08.2008.
- Kreisl, William C., Kimberly J. Jenko, Christina S. Hines, Chul Hyoung Lyoo, Winston Corona, Cheryl L. Morse, Sami S. Zoghbi, et al. 2013. « A Genetic Polymorphism for Translocator Protein 18 KDa Affects Both in Vitro and in Vivo Radioligand Binding in Human Brain to This Putative Biomarker of Neuroinflammation ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (1): 53-58. doi:10.1038/jcbfm.2012.131.
- Larcher, J. C., J. L. Vayssiere, F. J. Le Marquer, L. R. Cordeau, P. E. Keane, A. Bachy, F. Gros, et B. P. Croizat. 1989. « Effects of Peripheral Benzodiazepines upon the O2 Consumption of Neuroblastoma Cells ». *European Journal of Pharmacology* 161 (2-3): 197-202.
- Le Bars, Didier. 2005. *Tomographie par Emission de Positons : les possibilités de marquage au Fluor 18*. Vol. Médecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique. 29 vol.
- Li, Fei, Yan Xia, Jens Meiler, et Shelagh Ferguson-Miller. 2013. « Characterization and Modeling of the Oligomeric State and Ligand Binding Behavior of Purified Translocator Protein 18 kDa from *Rhodobacter sphaeroides* ». *Biochemistry* 52 (34): 5884-99. doi:10.1021/bi400431t.
- Li, H., B. Degenhardt, D. Tobin, Z. X. Yao, K. Tasken, et V. Papadopoulos. 2001. « Identification, Localization, and Function in Steroidogenesis of PAP7: A Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor- and PKA (R1alpha)-Associated Protein ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (12): 2211-28. doi:10.1210/mend.15.12.0736.
- Li, Zibo, et Peter S. Conti. 2010. « Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Development of Theranostic Agents that Co-Deliver Therapeutic and Imaging Agents*, 62 (11): 1031-51. doi:10.1016/j.addr.2010.09.007.

- Maeda, Jun, Makoto Higuchi, Motoki Inaji, Bin Ji, Eisuke Haneda, Takashi Okauchi, Ming-Rong Zhang, Kazutoshi Suzuki, et Tetsuya Suhara. 2007. « Phase-Dependent Roles of Reactive Microglia and Astrocytes in Nervous System Injury as Delineated by Imaging of Peripheral Benzodiazepine Receptor ». *Brain Research* 1157 (juillet): 100-111. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.054.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J. M. Jürgensmeier, S. A. Susin, H. L. Vieira, M. C. Prévost, et al. 1998. « Bax and Adenine Nucleotide Translocator Cooperate in the Mitochondrial Control of Apoptosis ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5385): 2027-31.
- Midzak, Andrew, Nagaraju Akula, Laurent Lecanu, et Vassilios Papadopoulos. 2011. « Novel Androstenetriol Interacts with the Mitochondrial Translocator Protein and Controls Steroidogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (11): 9875-87. doi:10.1074/jbc.M110.203216.
- Mock, B. H., W. Winkle, et M. T. Vavrek. 1997. « A Color Spot Test for the Detection of Kryptofix 2.2.2 in [18F]FDG Preparations ». *Nuclear Medicine and Biology* 24 (2): 193-95.
- Nalis, Julia. 2009. *Synchronisation respiratoire en tomographie par émission de positions couplée à un tomodensitomètre : étude des paramètres d'acquisition et comparaison de deux systèmes de synchronisation*. Toulouse 3. <http://www.theses.fr/2009TOU30197>.
- Ostuni, Mariano A., Robert Ducroc, Gabriel Péranzi, Marie-Christine Tonon, Vassilios Papadopoulos, et Jean-Jacques Lacapere. 2007. « Translocator Protein (18 KDa) Ligand PK 11195 Induces Transient Mitochondrial Ca²⁺ Release Leading to Transepithelial Cl⁻ Secretion in HT-29 Human Colon Cancer Cells ». *Biology of the Cell* 99 (11): 639-47. doi:10.1042/BC20070048.
- Paans, AMJ. 1997. « Energies and Ranges of Positrons ». http://www.med.harvard.edu/jpnm/physics/isotopes/pos_range.html.
- Papadopoulos, Vassilios, Mario Baraldi, Tomás R. Guilarte, Thomas B. Knudsen, Jean-Jacques Lacapère, Peter Lindemann, Michael D. Norenberg, et al. 2006. « Translocator Protein (18kDa): New Nomenclature for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Based on Its Structure and Molecular Function ». *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (8): 402-9. doi:10.1016/j.tips.2006.06.005.
- Peyronneau, Marie-Anne, Wadad Saba, Sébastien Goutal, Annelaure Damont, Frédéric Dollé, Michael Kassiou, Michel Bottlaender, et Héric Valette. 2013. « Metabolism and Quantification of [(18F)]DPA-714, a New TSPO Positron Emission Tomography Radioligand ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 41 (1): 122-31. doi:10.1124/dmd.112.046342.
- « Pharmacopée européenne 9e Edition | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament ». 2017. Consulté le mai 29. <https://www.edqm.eu/fr/Pharmacopee-europeenne-9e-Edition>.
- « Recherches impliquant la personne humaine (RIPH) - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». 2017. Consulté le mai 19. [http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Recherches-impliquant-la-personne-humaine-RIPH/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Recherches-impliquant-la-personne-humaine-RIPH/(offset)/0).
- Rupprecht, Rainer, Vassilios Papadopoulos, Gerhard Rammes, Thomas C. Baghai, Jinjiang Fan, Nagaraju Akula, Ghislaine Groyer, David Adams, et Michael Schumacher. 2010. « Translocator Protein (18 KDa) (TSPO) as a Therapeutic Target for Neurological and Psychiatric Disorders ». *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (12): 971-88. doi:10.1038/nrd3295.

- Rupprecht, Rainer, Gerhard Rammes, Daniela Eser, Thomas C. Baghai, Cornelius Schüle, Caroline Nothdurfter, Thomas Troxler, et al. 2009. « Translocator Protein (18 KD) as Target for Anxiolytics without Benzodiazepine-like Side Effects ». *Science (New York, N. Y.)* 325 (5939): 490-93. doi:10.1126/science.1175055.
- Saba, Wadad, Sébastien Goutal, Bertrand Kuhnast, Frédéric Dollé, Sylvain Auvity, Yoan Fontyn, Jérôme Cayla, Marie-Anne Peyronneau, Héric Valette, et Nicolas Tournier. 2015. « Differential Influence of Propofol and Isoflurane Anesthesia in a Non-Human Primate on the Brain Kinetics and Binding of [18F]DPA-714, a Positron Emission Tomography Imaging Marker of Glial Activation ». *European Journal of Neuroscience* 42 (1): 1738-45. doi:10.1111/ejn.12946.
- Schoultz, Bent W., Brian J. Reed, János Marton, Frode Willoch, et Gjermund Henriksen. 2013. « A Fully Automated Radiosynthesis of [18F]Fluoroethyl-Diprenorphine on a Single Module by Use of SPE Cartridges for Preparation of High Quality 2-[18F]Fluoroethyl Tosylate ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 18 (6): 7271-78. doi:10.3390/molecules18067271.
- Setiawan, Elaine, Alan A. Wilson, Romina Mizrahi, Pablo M. Rusjan, Laura Miler, Grazyna Rajkowska, Ivonne Suridjan, et al. 2015. « Role of Translocator Protein Density, a Marker of Neuroinflammation, in the Brain during Major Depressive Episodes ». *JAMA Psychiatry* 72 (3): 268-75. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.2427.
- Taketani, S., H. Kohno, M. Okuda, T. Furukawa, et R. Tokunaga. 1994. « Induction of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors during Differentiation of Mouse Erythroleukemia Cells. A Possible Involvement of These Receptors in Heme Biosynthesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (10): 7527-31.
- Tamse, CT, Lu X, Mortel Eg, Cabrales E, Feng W, et Schaefer S. 2008. « The Peripheral Benzodiazepine Receptor Modulates Ca²⁺-Transport through the VDAC in Rat Heart Mitochondria ». *Journal of Clinical and Basic Cardiology* 11 (1): 24-29.
- Veenman, Leo, Vassilios Papadopoulos, et Moshe Gavish. 2007. « Channel-like Functions of the 18-KDa Translocator Protein (TSPO): Regulation of Apoptosis and Steroidogenesis as Part of the Host-Defense Response ». *Current Pharmaceutical Design* 13 (23): 2385-2405.
- Veenman, Leo, Yulia Shandalov, et Moshe Gavish. 2008. « VDAC Activation by the 18 KDa Translocator Protein (TSPO), Implications for Apoptosis ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (3): 199-205. doi:10.1007/s10863-008-9142-1.
- Verma, A., et S. H. Snyder. 1988. « Characterization of Porphyrin Interactions with Peripheral Type Benzodiazepine Receptors ». *Molecular Pharmacology* 34 (6): 800-805.
- Vicidomini, Caterina, Mariarosaria Panico, Adelaide Greco, Sara Gargiulo, Anna Rita Daniela Coda, Antonella Zannetti, Matteo Gramanzini, et al. 2015. « In vivo imaging and characterization of [18F]DPA-714, a potential new TSPO ligand, in mouse brain and peripheral tissues using small-animal PET ». *Nuclear Medicine and Biology* 42 (3): 309-16. doi:10.1016/j.nucmedbio.2014.11.009.
- Walther, Martin, Peter Gebhardt, Philipp Grosse-Gehling, Lydia Würbach, Ingo Irmeler, Stephan Preusche, Muhammad Khalid, et al. 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 ». *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine* 69 (6): 852-57. doi:10.1016/j.apradiso.2011.02.040.
- Weizman, Abraham, Ruth Burgin, Yermiyahu Harel, Leon Karp, et Moshe Gavish. 1995. « Platelet peripheral-type benzodiazepine receptor in major depression ». *Journal of Affective Disorders* 33 (4): 257-61. doi:10.1016/0165-0327(94)00098-T.

Yeliseev, A. A., et S. Kaplan. 2000. « TspO of Rhodobacter Sphaeroides. A Structural and Functional Model for the Mammalian Peripheral Benzodiazepine Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (8): 5657-67.

Annexes

Annexe 1. Séquences protéiques du TSPO au sein de différentes espèces (F. Li et al. 2013)	95
Annexe 2. Doses efficaces par organe et corps entier du [¹⁸ F]DPA-714.....	96
Annexe 3. Autorisation ASN.....	97
Annexe 4. Check-list de la synthèse du [¹⁸ F]DPA-714.....	99
Annexe 5. Fiche d'enregistrement de production	100



Annexe 2. Doses efficaces par organe et corps entier du [¹⁸F]DPA-714

Table 1. Extrapolated radiation doses for [¹⁸F]DPA-714

Target Organ	mGy/MBq	Contribution to EDE [mSv/MBq]	Contribution to ED [mSv/ MBq]
Adrenals	6.31E-02	3.78E-03	3.15E-04
Brain	5.00E-03	0.00E000	2.50E-05
Breasts	1.25E-02	1.88E-03	6.25E-04
Gallbladder Wall	1.74E-02	0.00E000	0.00E000
LLI Wall	2.09E-02	0.00E000	2.50E-03
Small Intestine	4.00E-02	2.40E-03	2.00E-04
Stomach Wall	1.52E-02	0.00E000	1.82E-03
ULI Wall	4.36E-02	2.62E-03	2.18E-04
Heart Wall	1.09E-01	6.55E-03	0.00E000
Kidneys	3.33E-02	2.00E-03	1.67E-04
Liver	2.42E-02	0.00E000	1.21E-03
Lungs	9.83E-02	1.18E-02	1.18E-02
Muscle	1.17E-02	0.00E000	5.85E-05
Ovaries	1.60E-02	4.00E-03	3.20E-03
Pancreas	2.17E-02	0.00E000	1.09E-04
Red Marrow	1.23E-02	1.47E-03	1.47E-03
Osteogenic Cells	1.65E-02	4.96E-04	1.65E-04
Skin	8.47E-03	0.00E000	8.47E-05
Spleen	2.66E-02	0.00E000	1.33E-04
Testes	6.82E-03	0.00E000	0.00E000
Thymus	1.66E-02	0.00E000	8.30E-05
Thyroid	1.77E-02	5.30E-04	8.83E-04
Urinary Bladder Wall	1.21E-02	0.00E000	6.05E-04
Uterus	1.49E-02	0.00E000	7.45E-05
Total Body	1.42E-02	0.00E000	0.00E000

Note: the value for the heart wall extrapolated on basis of the BioD data was 0.109 mGy/MBq. This was used for calculation with OLINDA. However, there is no weighting factor for the heart given in the recommendations from the international commission on radiological protection (ICRP 1991).

Even within the remainder the heart is not considered. Thus, the weighting factor would be "0" for the ED determination. Therefore, the heart has an ED of 0.00.

Table 2. Estimated human radiation doses for [¹⁸F]DPA-714 and the corresponding values obtained for [¹⁸F]FDG.

Ligand	Gender	EDE [mSv/MBq]	ED [mSv/ MBq]
[¹⁸ F]DPA-714	Male (hermaphroditic model)	0.0375	0.0257
[¹⁸ F]FDG	Male-Female		0.024-0.031

Annexe 3. Autorisation ASN

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE



DIRECTION DU TRANSPORT ET DES SOURCES

AUTORISATION D'EXERCER UNE ACTIVITE NUCLEAIRE

Le Président de l'Autorité de sûreté nucléaire,
Vu le code de la santé publique, notamment ses articles L.1333-4 et R.1333-17 ;
Vu le code du travail, notamment ses articles R.4451-1 à R.4451-144 ;
Vu le code de l'environnement, notamment son article L.592-21 ;
Vu l'autorisation précédemment délivrée sous la référence CODEP-DTS-2016-005099 du 10/02/2015 ;
Vu les résultats de la consultation du public réalisée du 11/10/2016 au 26/10/2016 ;
Après examen de la demande reçue le 19/05/2016 et présentée par le CHU de Toulouse, cosignée par le chef d'établissement (formulaires datés du 14/04/2016, du 19/09/2016 et du 18/10/2016) ;

DECIDE

Article 1 : L'autorisation d'exercer une activité nucléaire est délivrée au CHU de Toulouse (personne morale titulaire de l'autorisation), représenté par son directeur général, signataire de la demande.

Cette autorisation permet au titulaire de :

- détenir et utiliser des accélérateurs de particules (y compris pour des activités de maintenance),
- fabriquer, détenir et utiliser des radionucléides en sources non scellées,
- détenir et utiliser des radionucléides en sources scellées,
- distribuer des radionucléides en sources non scellées.

Cette autorisation est accordée aux seules fins :

- de fabrication et de distribution de médicaments radiopharmaceutiques destinés à la recherche biomédicale,
- de fabrication et de distribution de produits radiochimiques destinés à la recherche, d'étalonnage.

Article 2 : L'exercice de l'activité nucléaire autorisée par la présente décision doit répondre aux caractéristiques et aux prescriptions mentionnées en annexes 1, 2 et 3 de la présente autorisation.

Article 3 : La présente autorisation, enregistrée sous le numéro **E015011**, est référencée CODEP-DTS-2016-042484. Elle met fin à l'autorisation référencée CODEP-DTS-2015-005099.

Article 4 : Cette autorisation, non transférable, est valable jusqu'au 30/10/2021.
Elle peut être renouvelée sur demande présentée à l'Autorité de sûreté nucléaire dans un délai minimum de six mois avant son échéance.

www.asn.fr
15 rue Louis Lejeune • CS 70013 • 92541 Montrouge cedex
Téléphone 01 46 16 40 00 • Fax 01 46 16 44 20



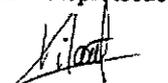
Article 5 : Les conditions d'exercice de l'activité nucléaire ainsi que les installations où est exercée cette activité doivent être conformes aux dispositions du code de la santé publique et du code du travail, ainsi qu'aux dispositions décrites dans le dossier de demande d'autorisation.

Dans le cas contraire, des sanctions sont prévues par les articles L.1337-5 et suivants du code de la santé publique.

Article 6 : La présente décision est notifiée au titulaire de l'autorisation.

Fait à Montrouge, le **15 NOV. 2016**

**Pour le Président de l'Autorité de sûreté nucléaire et par délégation,
La cheffe du bureau de la radioprotection et des sources,**



Sylvie RODDE



Annexe 4. Check-list de la synthèse du [¹⁸F]DPA-714

 <p>RADIOPHARMACIE CENTRE TEP</p>	<p>CHECK LIST SYNTHÈSE</p> <p>[¹⁸F]DPA-714</p>	<p>Code doc : FECLDPA 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 : Interface AV45, méthode DPA	
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	Mise en place du solvant HPLC DPA (45 % Éthanol, 55% d'Acétate de sodium) 2mL/ min Mise en place la colonne semi préparative dédiée DPA (Luna Phenomenex)	
8	En position load : remplissage de SC 1 avec 0.6 ml de Krytofix puis position inject!!!	
9	Remplissage SC 2 : 2mg de précurseur DPA dans 1 ml de DMSO	
10	Remplissage SC 5: 2 ml d'éthanol	
11	Remplissage SC8 : 5 ml d'acétonitrile	
12	Remplissage SC10 : 10 mL d'EPPI	
13	Vérification fermeture hermétique des flacons SC	
14	Mise en place de la QMA	
15	Mise en place d'une C18 conditionnée avec 10 mL d'éthanol suivi de 10mL d'eau	
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	

Centre de Tomographie en Emission de Positons CHU Purpan



Annexe 5. Fiche d'enregistrement de production

 RADIOPHARMACIE CENTRE TEP	FICHE D'ENREGISTREMENT DE LA PRODUCTION ET DU CONTRÔLE DE QUALITE DU ¹⁸F] DPA714	Code doc : FECQDPA Version : 2 Auteur : ASB Validé par : Date d'application : Page 1 / 3
---	--	---

DATE DE LA SYNTHÈSE :

1. Préparation de l'automate

Vial	Réactifs	Volume / [C]	Origine. numéro de lot
SC1	Kryptofix	550µL	
SC2	Précurseur DPA	2 mg	
SC2	Solvant DMSO	1000 µL	
SC5	Ethanol	2 mL	
SC8	Acétonitrile	5 mL	
SC10	EPPI	10 mL	

2. Déroulement de la synthèse :

Début de synthèse à

Activité Target		Reste dans Target	
Activité sur QMA		Reste sur QMA	
Activité dans réacteur		Reste dans réacteur après transfert	
Activité fixée sur C18		Activité restante sur C18	

Durée du transfert sur HPLC : secondes

3. Résultats :

Activité transférée dans Hotte	Mbq
Volume transféré	mL
Rendement de synthèse	%
Volume prélevé	mL

Lot DPA 714	
Lot NaCl 0.9 %	

Centre de Tomographie en Émission de Positons
CHU Purpan



 RADIOPHARMACIE CENTRE IEP	FICHE D'ENREGISTREMENT DE LA PRODUCTION ET DU CONTRÔLE DE QUALITE DU ¹⁸F] DPA714	Code doc : FECQDPA Version : 2 Auteur : ASB Validé par : Date d'application : Page 2 / 3
--	--	---

Etiquette de la préparation :

4. CONTROLES SYSTEMATIQUES

4.1. Contrôles libératoires

Limpidité	OK
pH	
Pureté radiochimique	
Pureté radionucléidique	
Spot Test kryptofix	< Limite de spécification

- Contrôle de la période de la [¹⁸F]-DPA-714 (pureté radionucléidique)

Prélèvement d'étalonnage			
Activité mesurée en mCi			
Calcul de la demi-vie :	$T_{1/2} = \frac{[\ln 2 \times (t_1 - t_0)]}{\ln (A_0/A_1)}$ $T_{1/2} =$	$T_{1/2} = \frac{[\ln 2 \times (t_2 - t_0)]}{\ln (A_0/A_2)}$ $T_{1/2} =$	

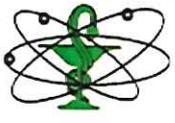
La valeur de la demi-vie doit être dans l'intervalle [105 – 115].

Vérifié par	Décision d'injection	Date :
<input type="checkbox"/> PRODUCTION ACCEPTEE	<input type="checkbox"/> PRODUCTION REJETEE	

4.2. Contrôles à résultats différés

Centre de Tomographie en Emission de Positons CHU Purpan



RADIOPHARMACIE  CENTRE TEP	FICHE D'ENREGISTREMENT DE LA PRODUCTION ET DU CONTRÔLE DE QUALITE DU ¹⁸[F] DPA714	Code doc : FECQDPA Version : 2 Auteur : ASB Validé par : Date d'application : Page 3 / 3
---	---	---

STERILITE <input type="checkbox"/>
Date du résultat : Résultat définitif :

5. CONTROLES A FREQUENCE VARIABLE

ENDOTOXINES <input type="checkbox"/>	
Opérateur : Date du contrôle :	Date du résultat : Résultat définitif :

Vérifié par : <input type="checkbox"/> CONFORME	Date : <input type="checkbox"/> NON CONFORME
---	--

Centre de Tomographie en Emission de Positons
CHU Purpan



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.



IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA NEURO-INFLAMMATION

La neuro-inflammation est un phénomène fréquemment associé à diverses pathologies neuronales ou psychiatriques et dont les effets sur ces pathologies demeurent ambigus voire contradictoires. Au CHU de Toulouse, quatre protocoles de recherches vont être mis en place dans le but de cartographier et quantifier la neuro-inflammation, grâce à l'imagerie moléculaire TEP ciblant la protéine de translocation. Cette protéine, surexprimée en cas d'activation microgliale, pourra être monitorée grâce à l'administration d'un médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE) spécifique : le [^{18}F]DPA-714. L'objectif de ce travail a été de mettre en place la synthèse automatisée ainsi que l'optimisation de ce MRPE au niveau de la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse. Dans un premier temps une revue de la littérature scientifique a permis de regrouper et de comparer les différentes synthèses existantes à ce jour afin de mettre en place une méthode de synthèse adaptée aux particularités de notre site. Ensuite les techniques de contrôle qualité permettant la libération des lots produits ont mises en place avant le début des premières synthèses. 16 synthèses ont été nécessaires à l'obtention des 3 lots de validation et à la rédaction du dossier de médicament expérimental. Le processus de fabrication du [^{18}F]DPA-714 a été approuvé par l'ANSM. Cependant les rendements et les activités de synthèse obtenus sont inférieurs à ceux décrits dans la littérature. Dans le cadre de protocoles de recherche, où la plateforme de fluoration sera fournisseur pour des centres extérieurs à Toulouse, la courte demi-vie du fluor 18 nécessitera l'amélioration des rendements et des activités volumiques.

Mots-clés : Neuro-inflammation, TSPO, [^{18}F]DPA-714, médicament expérimental, ANSM

MOLECULAR IMAGING OF BRAIN INFLAMMATION

Neuroinflammation is frequently associated with neurological and psychiatric disorders, but its implication in these illness remain ambiguous. The translocator protein (TSPO) is up-regulated in pathological conditions, coinciding with microglial activation. Four clinical trials will be set up at the University Hospital Center of Toulouse, in order to map and quantify brain inflammation by positron emission tomography (PET). In these studies an experimental drug will be used: the [^{18}F]DPA-714, a specific TSPO ligand. The aim of this work was to set up the fully automated synthesis on our robotic system and its optimization in our center. First we did a review of recent literature in the field to compare the current knowledge. Then we set up quality controls before the first synthesis, in order to allow the batch release. Sixteen synthesis have been made to obtain the validation batches and to write the validation file. [^{18}F]DPA-714 synthesis has been approved by competent authority (ANSM). However, the radiochemical yields (RCY) of fluorine-18 (^{18}F) incorporation are lower than those in the literature. In the context of clinical research, our center will provide others hospital centers with [^{18}F]DPA-714. Moreover, the short half-life of ^{18}F will force us to improve our RCY and our activity concentrations.

Keywords: Brain inflammation, TSPO, [^{18}F]DPA-714, experimental drug, ANSM

