
SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES.....	6
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	9
LE SYSTÈME NERVEUX	10
I. Unité Neuro-vasculaire (UNV).....	10
1. Les cellules endothéliales.....	11
2. Les péricytes	12
3. Les cellules gliales	13
a. Les astrocytes	13
b. Les microglies.....	14
4. Les neurones.....	16
II. Un neurotransmetteur : l'acétylcholine.....	17
1. Voies cholinergiques.....	17
2. Rôle.....	19
a. En périphérie	19
b. Au niveau central.....	19
3. Synthèse	19
4. Action sur des récepteurs spécifiques	21
5. Dégradation	23
III. Inhibiteurs des acétylcholinestérases	26
1. Classification	26
2. Mode d'action.....	27
a. Inhibition réversible : exemple du Donépézil.....	27
b. Inhibition irréversible : exemple des organophosphorés.....	27
3. Contexte d'utilisation des inhibiteurs d'acétylcholinestérases	28
a. Agriculture/ Armes chimiques	28
b. En thérapie.....	32
IMAGERIE MÉDICALE <i>in vivo</i>	35
I. Tomographie par émission de positons (TEP).....	36
1. Principe <i>in vivo</i>	36

2.	Radiochimie : couplage de l'isotope radioactif avec le traceur.....	38
3.	Injection du radiotracer et réaction nucléaire associée.....	39
4.	La détection	40
5.	Reconstruction.....	40
II.	Radiotraceurs utilisés.....	41
1.	Pour suivre le métabolisme du glucose : le 2-désoxy-2-[¹⁸ F]fluoro-D-glucose.....	41
2.	Pour suivre la neuroinflammation : marqueur glial, la protéine translocatrice de 18 KDa (TSPO).....	43
a.	Localisation et structure	43
b.	Fonctions et rôles physiologiques.....	44
c.	Surexpression de TSPO et inflammation.....	44
d.	Radiotraceurs ciblant TSPO.....	45
	OBJECTIFS DES ÉTUDES.....	50
	RÉFÉRENCES.....	52

ÉTUDE 1

Intoxication avec un inhibiteur irréversible des acétylcholinestérases, l'organophosphoré NIMP (analogue du sarin) dans un modèle murin

59

	INTRODUCTION.....	60
I.	Les organophosphorés (OPs)	60
1.	Voies de pénétration dans l'organisme	60
2.	Voie d'élimination.....	61
II.	Intoxication aigüe vs chronique.....	62
1.	Intoxication aigüe.....	62
2.	Intoxication chronique.....	63
III.	Lien entre l'exposition aux OPs et le développement de maladies.....	64
1.	Syndrome de la guerre du Golfe.....	64
2.	Pathologies neurologiques.....	65
a.	Maladies neurodégénératives	65
b.	Hyperexcitabilité neuronale.....	65
IV.	Impact sur les fonctions cérébrales	67
1.	Etudes cliniques et précliniques.....	67
a.	Troubles psychiatriques et comportementaux	67
b.	Modifications des rythmes cérébraux	68
c.	Modifications des macrostructures/microstructures du SNC.....	70
d.	Neuroinflammation.....	71

2.	Imagerie TEP suite à une intoxication par un OP pour suivre la réponse inflammatoire ...	73
V.	Traitements d'urgence pour assurer fonctions vitales	76
VI.	Besoin de traitements neuroprotecteurs	78
VII.	Modèles animaux.....	80
	OBJECTIFS	83
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	84
I.	Modèle d'intoxication au NIMP	84
1.	Détermination de la DL50	84
II.	Doses utilisées (0.5 DL50 versus 0.9 DL50)	85
III.	Injection en sous cutanée	85
IV.	Symptômes	85
V.	Imagerie TEP longitudinale au [¹⁸ F]DPA-714.....	86
1.	Phase 1 : Détermination d'une fenêtre thérapeutique d'action.....	86
2.	Phase 2 : traitement neuroprotecteur (Montelukast)	87
a.	Dose de MK et administration	87
VI.	Immunohistofluorescence	88
VII.	Analyse des données et statistiques	89
	RÉSULTATS.....	90
I.	Etude comportementale.....	90
II.	Suivi de l'évolution de la neuroinflammation après une intoxication au NIMP	92
1.	Fixation du [¹⁸ F]DPA-714.....	92
a.	Suivi longitudinal avant traitement anti-inflammatoire.....	93
b.	Après traitement anti-inflammatoire.....	96
III.	Analyse histologique	97
	DISCUSSION	99
	RÉFÉRENCES.....	105

ÉTUDE 2

	Thérapie utilisant un inhibiteur réversible des acétylcholinestérases, le Donépézil, dans un modèle préclinique de la maladie d'Alzheimer.....	112
	INTRODUCTION.....	113
I.	Une maladie multifactorielle : principaux phénomènes physiopathologiques.....	115
1.	Atrophie cérébrale	115
2.	Accumulation de protéines mal conformées	116
a.	Les plaques amyloïdes	116
b.	Les dégénérescences neurofibrillaires.....	120

c. L'hypothèse prion	123
3. Atteinte du système cholinergique	124
II. Imagerie TEP des biomarqueurs de la MA	126
1. Pour un suivi de l'évolution de la maladie	126
a. Imagerie TEP du métabolisme cérébral du glucose	126
b. Imagerie TEP des agrégats protéiques	127
c. Imagerie TEP du système cholinergique	130
2. Pour tester des approches thérapeutiques	131
OBJECTIFS	133
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	134
I. Produits chimiques et radiochimiques.....	134
II. Modèle murin de la maladie d'Alzheimer	134
III. Traitement au Donépézil	134
IV. Acquisition de l'imagerie TEP au [¹⁸ F]FDG.....	135
V. Analyse des données TEP au [¹⁸ F]FDG	135
VI. Caractérisation de la charge amyloïde dans le modèle <i>icv</i> Aβ ₂₅₋₃₅	136
1. Autoradiographie au [¹⁸ F]Florbetapir.....	136
2. Imagerie par rayons X à contraste de phase	137
VII. Analyse statistique	138
1. Analyse régionale.....	138
2. Approche par cartographie paramétrique statistique	138
RÉSULTATS.....	139
I. Imagerie TEP cérébrale au [¹⁸ F]FDG.....	139
II. Charge amyloïde	141
1. Autoradiographie au [¹⁸ F]florbetapir	141
2. Imagerie par rayons X à contraste de phase	143
DISCUSSION	144
CONCLUSION	147
RÉFÉRENCES.....	148

ÉTUDE 3

Imagerie TEP avec le [¹⁸F]-2- fluoro-2-désoxy-sorbitol ([¹⁸F]FDS) pour la détermination quantitative de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique induite par les ultrasons focalisés transcrâniens. ... 155

INTRODUCTION.....	156
I. Altérations pathologiques de la barrière hémato-encéphalique (BHE)	156
II. Biomarqueurs de l'intégrité de la BHE	157

III.	Méthodes d'imagerie utilisées pour évaluer la perméabilité de la BHE <i>in vivo</i>	158
IV.	[¹⁸ F]-2- fluoro-2-désoxy-sorbitol ([¹⁸ F]FDS) : un traceur candidat.....	161
V.	Ouverture transitoire de la BHE grâce à la méthode des ultrasons focalisés (FUS).....	162
	OBJECTIFS	164
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	165
I.	Production du [¹⁸ F]FDS	165
II.	Ultrasons focalisés (FUS).....	165
III.	Test d'extravasation au bleu d'Evans	167
IV.	Imagerie TEP au [¹⁸ F]FDS.....	168
1.	Approches quantitatives en TEP : la modélisation	169
a.	Modèle Logan	169
b.	Modèle à 1-compartiment (1-cpt)	170
V.	Analyse Statistique.....	171
	RÉSULTATS	172
	DISCUSSION	179
	CONCLUSION	184
	RÉFÉRENCES.....	185
	 CONCLUSION GÉNÉRALE	 189
	RÉFÉRENCES.....	192

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La structure l'unité neurovasculaire (UNV).....	11
Figure 2: Activation et polarisation des microglies suite à un événement pathologique.....	15
Figure 3: Principales projections cholinergiques du système nerveux central.....	18
Figure 4: Schéma générique sur le fonctionnement de la transmission synaptique au sein du système nerveux.....	20
Figure 5: Biosynthèse de l'acétylcholine.....	21
Figure 6: Activation d'un récepteur nicotinique.....	22
Figure 7: Activation d'un récepteur muscarinique.....	23
Figure 8: Processus de dégradation de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase.....	25
Figure 9: Exemples d'inhibiteurs des acétylcholinestérases.....	26
Figure 10: Structure du Donépézil : inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase.....	27
Figure 11: Inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase par un organophosphoré.....	28
Figure 12: Structure chimique générale d'un organophosphoré.....	29
Figure 13: Conséquences des inhibiteurs des AChE dans un contexte sain.....	32
Figure 14: Conséquences des inhibiteurs des AChE dans un contexte pathologique.....	33
Figure 15: Examen murin utilisant le [¹⁸ F]FDG.....	37
Figure 16: Réaction d'annihilation entre deux antiparticules.....	39
Figure 17: Schéma de détection des photons gamma émis.....	40
Figure 18: [¹⁸ F]FDG dans la cellule.....	41
Figure 19: Cas clinique représentatif d'un lymphome à cellules B diffus.....	42
Figure 20: Modification de l'expression de la protéine translocatrice de 18 KDa (TSPO).....	45
Figure 21: Principe de l'imagerie TEP TSPO.....	46
Figure 22: Objectifs des études.....	51
Figure 23: Voies de pénétration des OPs et du risque potentiel.....	61
Figure 24: Effets de l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	63
Figure 25: Différentes phases de l'épilepsie.....	66
Figure 26: Principe de l'électroencéphalographie.....	69
Figure 27: Fixation du [¹⁸ F]PBR111 dans un modèle rat intoxiqué au DFP.....	74
Figure 28: Réactivation d'une AChE par la pralidoxime (2-PAM).....	77
Figure 29: Diversité des modèles animaux utilisés dans le cadre d'une intoxication à un OP.....	81
Figure 30: Schéma chronologique de l'étude longitudinale en imagerie TEP utilisant le [¹⁸ F]DPA-714 dans un modèle murin d'intoxication à un OP (NIMP).....	86

Figure 31: Schéma récapitulatif du suivi en imagerie suite au traitement protecteur.....	88
Figure 32: Symptomatologie suite à l'intoxication avec le NIMP.	91
Figure 33: Délai d'apparition des modifications comportementales selon la dose sous létale de NIMP utilisée	91
Figure 34: Coefficient de variation des AUC dans les différentes régions analysées et représenté pour chaque groupe et aux différents temps post-intoxication.....	92
Figure 35: Fixation du [¹⁸ F]DPA-714 sur cerveau entier au différents temps post-exposition dans les trois groupes d'intoxication : 0,5 DL50, 0,9 DL50 et contrôle (Ctrl).....	93
Figure 36: Fixation du [¹⁸ F]DPA-714 au niveau du cortex.....	94
Figure 37: Fixation du [¹⁸ F]DPA-714 au niveau de l'hippocampe	95
Figure 38: Fixation du [¹⁸ F]DPA-714 après traitement anti-inflammatoire.....	97
Figure 39: Immunofluorescence sur coupes cérébrales murines.....	98
Figure 40: Continuum de la maladie d'Alzheimer.	114
Figure 41: Stades de Schletens pour l'atrophie hippocampique.....	115
Figure 42: Clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)	117
Figure 43: Schéma du processus d'agrégation des protéines formant les fibrilles.	118
Figure 44: Propagation des dépôts amyloïdes selon les stades de Thal.....	120
Figure 45: Processus d'agrégation de la protéine tau.....	121
Figure 46: Schéma de la propagation des dégénérescences neurofibrillaires.	122
Figure 47: Phénomène de nucléation dans les protéinopathies	123
Figure 48: TEP au [¹⁸ F]FDG chez des sujets sain, suspecté ou avec une MA avancée	127
Figure 49: Fixation cérébrale du [¹¹ C]-PiB.....	128
Figure 50: Images cérébrales TEP utilisant le [¹⁸ F]Flortaucipir	129
Figure 51: Exemples de traceurs TEP utilisés dans la maladie d'Alzheimer.....	131
Figure 52: Images TEP du [¹¹ C]-PiB des patients traités par bapineuzumab ou placebo	132
Figure 53: Mécanisme du contraste de phase en ligne.....	137
Figure 54: Fixation du 18F-FDG via une analyse par volume d'intérêt (Voi) chez les souris.	140
Figure 55: Capture cérébrale du 18 F-FDG reflétant la réponse thérapeutique du Donépézil (DPZ)...	141
Figure 56: Autoradiographie avec le [¹⁸ F]AV45 sur le modèle icv d'AB ₂₅₋₃₅	142
Figure 57: Autoradiographie in vitro avec le [¹⁸ F]AV45 sur un modèle rat Alzheimer (TgF344).....	142
Figure 58: Imagerie par rayons X à contraste de phase pour caractériser la charge amyloïde dans le modèle murin icv Aβ ₂₅₋₃₅	143
Figure 59: Principe de l'imagerie par Résonance magnétique IRM.....	159
Figure 60: Structures chimiques des agents de contrastes couramment utilisés en IRM.....	159
Figure 61: Images IRM T1W représentatives chez 3 patients atteints de glioblastome.....	160

Figure 62: Images séquentielles de projection d'intensité maximale (MIP) corps entier chez l'homme après injection du [¹⁸ F]FDS	161
Figure 63: Images IRM représentatives avant et après ouverture de la BHE suite à un protocole FUS au niveau de tumeurs cérébrales chez le rat.....	163
Figure 64: Structures chimiques du mannitol, sorbitol, [¹⁸ F]-2-fluoro-2-deoxy-glucose ([¹⁸ F]-FDG) et du 18 F-2-fluoro-2-deoxy-sorbitol ([¹⁸ F]FDS).	165
Figure 65: Schématisation du protocole expérimental utilisé pour cette étude.....	167
Figure 66: Exemple de Volume d'intérêt VOI pris en compte pour l'extraction des courbes d'activité en fonction du temps sur les examens TEP dynamiques.....	169
Figure 67: Schématisation d'un modèle à un compartiment en imagerie TEP	170
Figure 68: Fixation du [¹⁸ F]FDS au niveau périphérique chez des souris NMRI nu/nu	172
Figure 69: Impact des ultrasons focalisés (FUS) sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) évaluée à l'aide de l'extravasation du bleu Evans.....	174
Figure 70: Cinétique du [¹⁸ F]2-fluoro-2-déoxy-sorbitol ([¹⁸ F]FDS).....	175
Figure 71: Pharmacocinétique des données TEP cérébrales du [¹⁸ F]FDS.....	177
Figure 72: Sensibilité des paramètres cinétiques pour décrire l'impact des US sur la distribution cérébrale du [¹⁸ F]FDS chez la souris.....	178

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les pathologies neurologiques sont sous-tendues par la mise en place de mécanismes cérébraux spécifiques participant à la progression de ces dernières. Des perturbations dans le métabolisme du glucose peuvent voir le jour et être régions cérébrales dépendantes selon la pathologie considérée. De plus, des réponses cellulaires neuroinflammatoires chroniques peuvent être responsables d'une exacerbation des symptômes observés cliniquement. Ces deux mécanismes universels reflètent le fonctionnement du système nerveux (SN) via l'interaction de diverses populations cellulaires. Des phénomènes moléculaires plus spécifiques sont mis en cause dans certaines pathologies cérébrales comme les maladies neurodégénératives. En effet, des agrégations protéiques de certaines protéines mal conformées font partie des marqueurs clés pour l'identification de ces pathologies. Des dysfonctionnements au sein de ces mécanismes cérébraux peuvent être investigués *in vivo* grâce à l'imagerie par émission de positons (TEP).

Pour mieux comprendre l'impact de ces mécanismes cérébraux intervenants dans certaines maladies neurologiques qui ont été investigués au cours de ma thèse, les composantes principales impliquées dans ces processus cérébraux vont être décrites dans ce premier chapitre.

LE SYSTÈME NERVEUX

Le système nerveux (SN) est composé de différentes entités, on distingue le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est composé du cerveau et de la moelle épinière. Le SNP est constitué de différents nerfs permettant d'envoyer les informations du SNC vers les organes périphériques et réciproquement de recevoir les informations périphériques pour les transmettre à la moelle épinière et/ou à l'encéphale. Divers types cellulaires assurent le bon fonctionnement du SN ayant des rôles structurels et fonctionnels distincts.

I. Unité Neuro-vasculaire (UNV)

Pour assurer le bon fonctionnement du SNC et maintenir l'homéostasie cérébrale, une barrière biologique permet d'isoler le SNC du reste du corps : la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière permet de faire le lien et de trier les substances entre la circulation sanguine (sang) et le SNC. Cette dernière permet de contrôler étroitement l'entrée et la sortie (influx vs efflux) des substances exogènes (médicaments, toxines) présentes dans le sang au sein du parenchyme cérébral faisant de celle-ci une entité ayant un rôle clé dans la protection du SN. L'unité

neurovasculaire est un ensemble anato-mo-fonctionnel au sein duquel les cellules composant la BHE (cellules endothéliales, péricytes, astrocytes), les cellules immunitaires (microglies) et les neurones vont étroitement entrer en interaction (**Figure 1**).

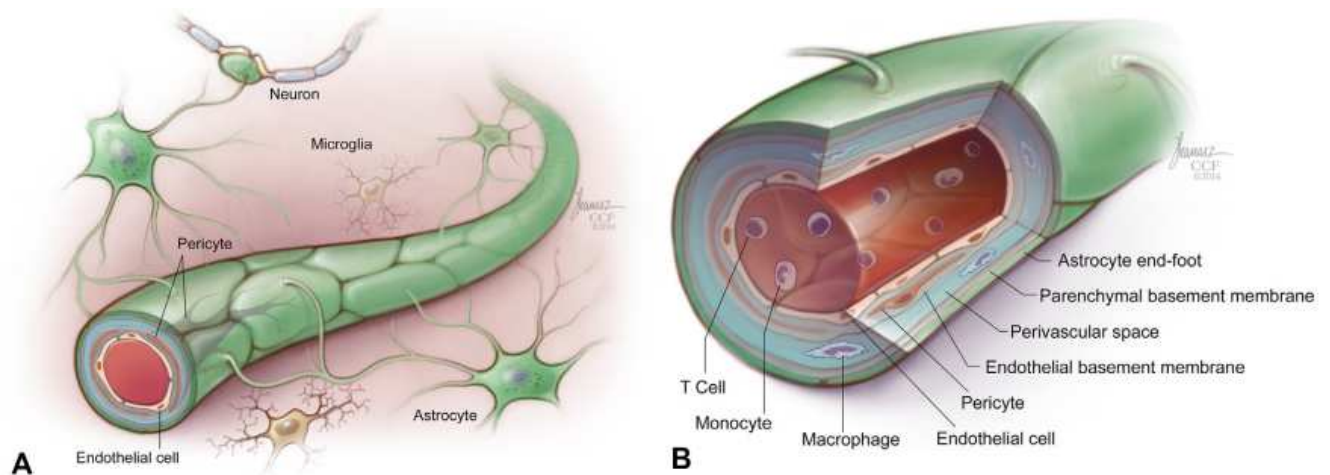


Figure 1: La structure l'unité neurovasculaire (UNV). (D'après Obermeier et al, 2016). (1)

Le concept de l'UNV comprend divers types de cellules qui contribuent toutes à la structure et à la fonction de la BHE. Les éléments anatomiques centraux sont les cellules endothéliales vasculaires qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, étroitement scellée par des jonctions inter-endothéliales. La membrane basale endothéliale enveloppe la face abluminale de l'endothélium et des péricytes. Les péricytes étendent des prolongements le long de la paroi externe du vaisseau (comme indiqué en A). Au niveau des veinules postcapillaires, les membranes basales endothéliales et parenchymateuses sont séparées et délimitent l'espace périvasculaire dans lequel résident les macrophages périvasculaires. Les astrocytes fixent des pieds terminaux à la face abluminale du vaisseau. Les neurones et les microglies sont des types de cellules centrales supplémentaires qui sont associés à la BHE et sont donc considérés comme des membres de l'UNV. Occasionnellement, les cellules du sang périphérique, telles que les lymphocytes et les monocytes circulant dans le flux sanguin dans des conditions saines, rejoignent l'UNV lorsqu'elles interagissent avec la surface luminaire de l'endothélium dans des conditions inflammatoires. (A) L'UNV en un coup d'œil. (B) Vue détaillée de la section transversale et des différentes couches.

1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment les vaisseaux sanguins cérébraux. Ces sont les premières cellules rentrant en jeu pour isoler physiquement le parenchyme cérébral de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales de la BHE sont composées de multiples types de jonctions permettant de s'interconnecter entre elles formant ainsi un endothélium imperméable et sélectif (2). Cependant, certaines molécules sont aptes à passer librement la BHE comme l'oxygène passant du sang vers le cerveau et le dioxyde de carbone empruntant le sens inverse. Cet échange par simple diffusion est indispensable pour permettre un apport énergétique aux

cellules composant l'UNV afin qu'elles assurent leur rôle. Les jonctions serrées sont donc les premières actrices dans le maintien de la perméabilité entravant ainsi les flux paracellulaires des molécules hydrophiles entre les cellules endothéliales. Elles permettent également de réguler la disposition des différents composés des cellules endothéliales via la séparation de leurs parties apicale et basolatérale. Une distribution organisée des lipides, des glycoprotéines, des récepteurs et des transporteurs est observée (3). Les jonctions serrées font intervenir des protéines transmembranaires spécifiques de la famille des claudines et des occludines ainsi que des molécules d'adhésions. Ces protéines sont en interaction directe avec le cytosquelette de la cellule grâce aux protéines de la zona occludens (4). L'interaction dynamique de ces diverses protéines permet de générer une barrière physique empêchant ainsi le passage de molécules non désirées ou dangereuses dans le parenchyme cérébral.

Les cellules de l'UNV ont quand même besoin de certaines molécules (glucose, acides aminés, nutriments) pour leur fonctionnement soulignant ainsi d'autres voies de passage pour permettre leur entrée dans le cerveau. En effet, pour permettre le passage de molécules des systèmes de transport facilités ou actifs sont nécessaires. Ils assurent ainsi les influx et les efflux d'une multitude de molécules nécessaire au maintien de l'homéostasie cérébrale (5). Les plus connus sont le transporteur de Glucose (GLUT-1) et la glycoprotéine P (P-gp). Pour certains composés un système d'endocytose peut être sollicité (6).

Des jonctions dites adhérentes sont également retrouvées entre cellules endothéliales faisant intervenir des protéines transmembranaires les cadhérines endothéliales vasculaires (VE-cadherin). Elles servent à la mise en place des jonctions serrées et agissent en synergie avec elles pour réguler la perméabilité (7).

2. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules qui vont recouvrir les cellules endothéliales. Elles vont être en interaction avec les cellules endothéliales grâce à des protéines N-cadhérines et des connexines. L'intégrité de la BHE sera assurée en partie par ces cellules par leurs fonctions d'angiogenèse et de stabilisation de la microvasculature (8). Elles contiennent des protéines contractiles permettant la régulation du diamètre des vaisseaux et du flux sanguin (9).

3. Les cellules gliales

Le cerveau est constitué de 90% de gliocytes. Que ce soit les astrocytes ou les microglies leurs rôles sont multiples au sein du SN.

a. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SN. Ces cellules étoilées avec de nombreux prolongements vont permettre de se connecter à l'environnement notamment en recouvrant 99% des micro-vaisseaux cérébraux. Ce sont des cellules de soutien et nourricières. En effet, ils vont transporter les principaux ions et protons (K^+ , Ca^{2+} , Na^+) pour maintenir la balance ionique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ils vont également participer à la neurotransmission en catabolisant des neurotransmetteurs ou en fournissant des précurseurs aux neurones (10). Les astrocytes régulent l'homéostasie métabolique en synthétisant le glycogène et en fournissant aux neurones des substrats énergétiques (11). Via le déploiement des pieds astrocytaires sur le réseau sanguin, ils vont être très impliqués dans la régulation du pH sanguin et dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Les astrocytes synthétisent une protéine la Sonic Hedgehog (SHH). Son action provoque une augmentation de l'expression des protéines participant à la formation des jonctions serrées (12). Hormis leurs rôles nourriciers et de soutien, en conformation activée ils participent à la mise en place des lignes de défense suite à un dommage cérébral. L'activation astrocytaire se fait via la surexpression d'une protéine qui constitue les filaments intermédiaires du cytosquelette : la « glial fibrillary acidic protein (GFAP) » (13). Ce qui va provoquer un changement morphologique cellulaire (hypertrophie). Une fois activés, ils vont avoir de multiples rôles. Ils peuvent former une cicatrice gliale englobant la lésion cérébrale et limitant ainsi sa propagation. Ils sont capables de promouvoir la réparation de la BHE et de limiter la neurodégénérescence (14). Cependant, ils peuvent présenter des effets néfastes sur le SN suite à leur activation. Ils vont ainsi produire des réactions cytotoxiques comme générer un stress oxydatif. Une inflammation chronique via une activation astrocytaire soutenue favorise l'apparition d'atteintes neuronales et une dérégulation de la perméabilité de la BHE dans diverses pathologies neurodégénératives (Parkinson, Maladie d'Alzheimer) (15).

Les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes participent à la formation d'une membrane basale endothéliale entourant les capillaires sanguins renforçant le maintien de la BHE.

Ces trois types cellulaires font partie intégrante de l'ensemble central communément appelé BHE. Cependant, l'UNV contient d'autres types cellulaires.

b. Les microglies

Pour protéger le SNC, des cellules résidentes, les microglies considérées comme les macrophages du SNC, sont la première ligne de défense immunitaire. Ce sont des cellules qui possèdent des ramifications cellulaires en constante interaction avec le parenchyme cérébral. Ces cellules très dynamiques permettent d'assurer l'homéostasie cérébrale. Elles arborent un phénotype et des propriétés fonctionnelles distinctes suivant leur état d'activation. Le processus d'activation des microglies s'effectue dès lors qu'un changement au sein de leur environnement proche se produit (entrée d'un pathogène, lésion cérébrale, changements dans la constitution du milieu extracellulaire...). Dans un état dit « de surveillance » ou « non activé », de nombreux prolongements cellulaires jouent le rôle de « senseur » au sein du microenvironnement (16). Dès qu'une modification de leur environnement est détectée, un changement morphologique va avoir lieu via la rétraction des prolongements et l'augmentation de la taille du corps cellulaire. En outre, l'expression de nouvelles protéines et la sécrétion de facteurs pro/anti inflammatoires va se produire. Elles vont également pouvoir dans certains cas proliférer et migrer au niveau du site lésionnel afin d'acquérir des activités de phagocytose pour faire disparaître les débris cellulaires.

Classiquement l'activation des microglies se définit selon une nomenclature basée sur deux stades d'activation : les microglies de type M1 dites « pro-inflammatoire » et les microglies de type M2 dites « anti-inflammatoire » (17). Cette classification « simpliste » des phénotypes microgliaux est remise en cause depuis quelques années suite à la démonstration de la capacité des microglies de passer d'un phénotype à un autre selon les conditions environnementales (18).

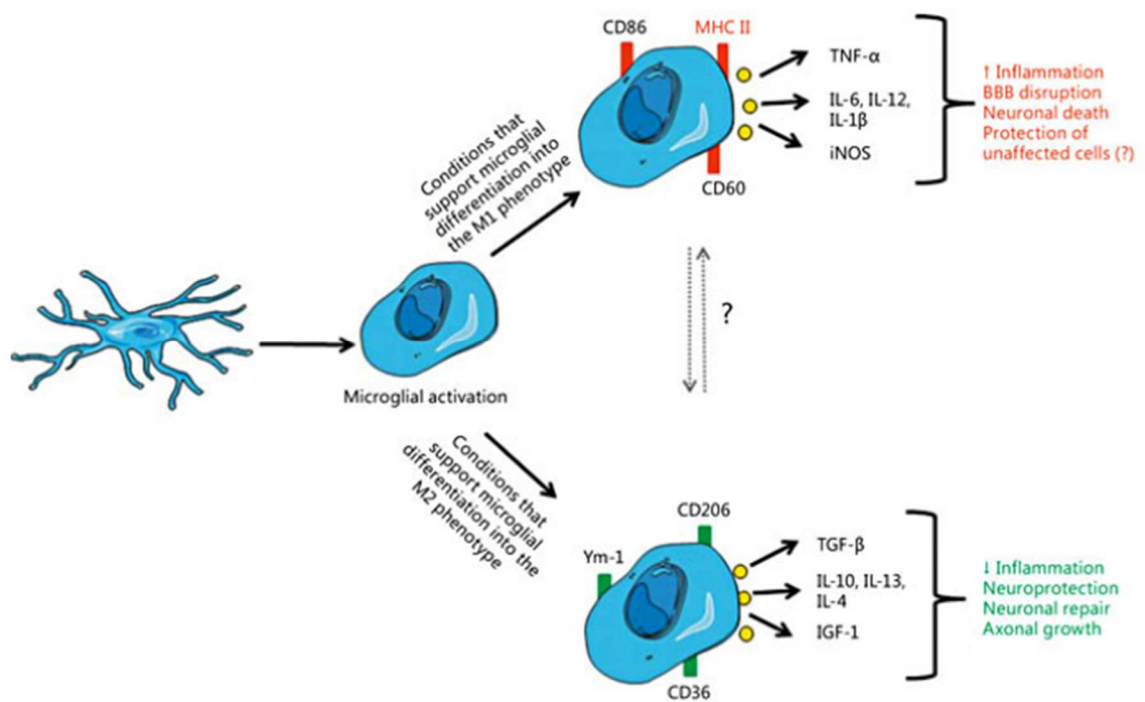


Figure 2: Activation et polarisation des microglies suite à un événement pathologique. (D'après Barakat et al, 2015) (19)

Des facteurs cellulaires spécifiques permettent d'activer et de polariser les microglies en des phénotypes spécifiques. Cependant, les facteurs permettant de passer d'un phénotype à un autre reste à élucider.

L'activation microgliale s'accompagne de la modification de l'expression de certains marqueurs cellulaires. A l'état basal, au sein des microglies non activées des marqueurs spécifiques de ce type cellulaire sont exprimés tel que Iba1, CD11b. En cas de processus d'activation, une augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques au sein des microglies est observée. Suivant le statut d'activation, elles possèdent des propriétés différentes. Cette activation est possible suite à l'intégration de signaux externes et internes à ces cellules.

Le phénotype pro-inflammatoire (M1) présente un effet plutôt néfaste sur le SNC. Ce phénotype promeut la mise en place de la mort neuronale, l'augmentation de la perméabilité de la BHE. Les répercussions engendrées par les microglies pro-inflammatoires peuvent être alors responsables de dommages cérébraux secondaires. Le type M2 quant à lui, est considéré comme anti-inflammatoire. La mise en place du phénotype anti-inflammatoire est décisive pour les processus de neuroprotection, de croissance axonale et de réparation neuronale (Figure 2) (20). Les microglies ne sont pas cantonnées à un phénotype particulier, elles sont très dynamiques et seraient capables de passer du phénotype M1 à M2 et inversement. Cependant, la dynamique et l'origine de leurs modifications de phénotypes restent à explorer.

Les cellules gliales composant l'UNV sont capables d'une grande communication permettant ainsi de réguler au mieux le réseau immunitaire qui est indispensable au bon fonctionnement de l'UNV (21).

4. Les neurones

Les neurones participent activement au maintien du bon fonctionnement du SNC via leur implication au sein de l'UNV. Les neurones sont en étroite interaction avec les astrocytes eux-mêmes connectés aux vaisseaux sanguins. Un astrocyte peut être connecté à 140 000 synapses. La formation d'une synapse tripartite va participer à la régulation de l'influx sanguin au niveau des zones cérébrales. Des changements de l'activité neuronale vont pouvoir être détectés par des récepteurs présents sur les pieds astrocytaires notamment glutamatergiques (22). L'augmentation du débit cérébral va permettre l'acheminement rapide et en plus grande quantité des molécules essentielles au fonctionnement des neurones (comme l'oxygène et les substrats énergétiques). Ce processus de couplage neurovasculaire est indispensable au sein du SNC (23).

Ils permettent également de maintenir la communication neuronale pour assurer les fonctions cérébrales.

II. Un neurotransmetteur : l'acétylcholine

Pour permettre la communication entre les neurones au sein du SN et assurer les diverses fonctions cérébrales, des molécules messagères sont synthétisées par les neurones : les neurotransmetteurs (nt). Il en existe 6 principaux (glutamate, acétylcholine, noradrénaline, sérotonine, dopamine et GABA). Ils ont un rôle soit excitateur ou inhibiteur selon leurs cibles et les récepteurs activés.

L'acétylcholine (Ach) a été le premier neurotransmetteur à être découvert par Otto Loewi en 1921 (*démonstration d'une activité de « neurotransmetteur », susceptible d'être collectée dans un organe et montrant une activité dans un autre organe dénervé (Otto Loewi) (24)*). C'est un neurotransmetteur largement distribué au sein du SN assurant un rôle essentiel dans la transmission synaptique que ce soit au sein des SNC et SNP.

1. Voies cholinergiques

Les voies cholinergiques sont largement distribuées au sein du SNC. La distinction de divers groupes de neurones cholinergiques peut s'effectuer suivant leurs localisations et leurs projections. Il en existe trois grandes catégories. Les neurones à projections diffuses, les neurones à projections locales retrouvés en grande proportion au niveau du striatum et les motoneurones de la moelle épinière. Dès 1980, Mesulam propose une classification des neurones cholinergiques à projections diffuses distinguant ainsi 8 sous-groupes. Ils sont regroupés à deux endroits distincts au niveau cérébral, des groupes sont situés au niveau du cerveau antérieur basal et les autres au niveau du tronc cérébral (**Figure 3**) (25).

Ces groupes de neurones seront alors regroupés sous le terme « Ch » avec l'attribution d'un numéro allant de 1 à 8. Chaque groupe cholinergique innerve une partie du cerveau distincte. Les groupes Ch1 et Ch2 innervent l'hippocampe, le noyau Ch3 innerve le cortex cingulaire et le bulbe olfactif. Le groupe Ch4 comprend le noyau basal de Meynert, le noyau préoptique magnocellulaire et la substance innommée de Reichert. Ce groupe va se projeter au niveau du néocortex et de l'amygdale. Les noyaux Ch5 à Ch8 se situent au niveau du tronc cérébral, et enfin les groupes Ch5 et Ch6 projettent vers le thalamus et l'hypothalamus (26).

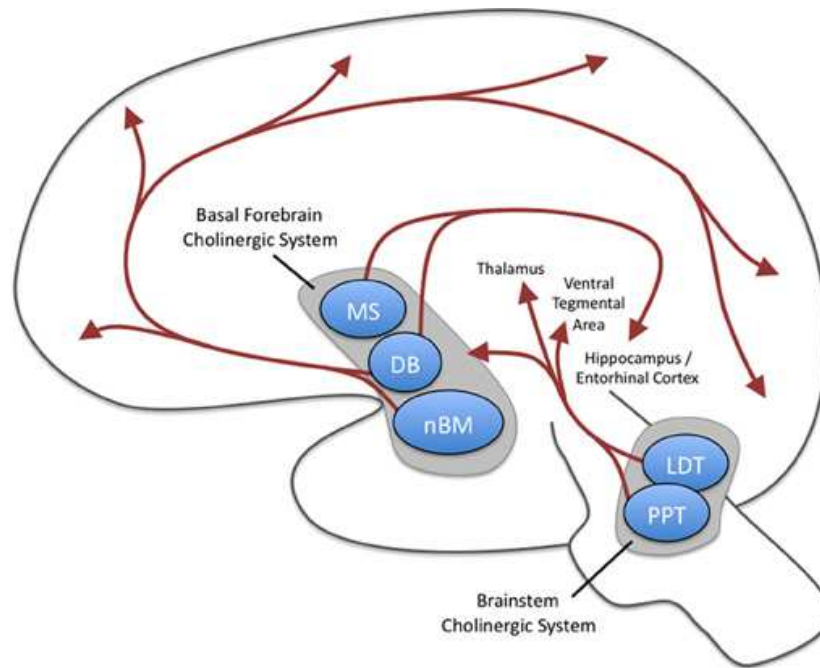


Figure 3: Principales projections cholinergiques du système nerveux central. (D'après Newman et al, 2012).

Il existe deux groupes de projections : le système cholinergique magnocellulaire de la base du cerveau antérieur et le système cholinergique du tronc cérébral. Le système cholinergique magnocellulaire de la base du cerveau antérieur comprend le noyau septal médian (MS), les branches verticale et horizontale de la bande diagonale de Broca (DB) et le noyau basal magnocellulaire (nBM). Le membre horizontal de la DB et le nBM ont des projections diffuses étendues vers le néocortex ainsi que des projections vers l'amygdale basolatérale et le bulbe olfactif (ces deux derniers ne sont pas représentés ici). Le MS et la branche verticale du DB projettent vers l'hippocampe et les cortex entorhinaux. Le système cholinergique du tronc cérébral comprend le noyau tegmental pédonculopontin (PPT) et le tegmentum pontin latérodorsal (LDT) et se projette principalement vers le thalamus mais aussi vers la région basale du cerveau antérieur.

A la vue de la forte innervation cholinergique cérébral, les voies cholinergiques sont certainement impliquées dans de nombreuses fonctions cérébrales.

2. Rôle

a. En périphérie

L'acétylcholine permet d'assurer le fonctionnement de la jonction neuromusculaire permettant ainsi la contraction musculaire. Les motoneurons vont se connecter aux fibres musculaires et la libération de l'Ach va permettre une dépolarisation locale de la cellule musculaire. Ce signal sera propagé au sein de la cellule musculaire et engendrera ainsi sa contraction (27).

b. Au niveau central

A la vue des diverses projections des neurones cholinergiques sur les diverses régions cérébrales, le système cholinergique doit être un acteur majeur dans la mise en place de diverses fonctions cérébrales. En effet, il a été montré que ce dernier avait un rôle dans une multitude de fonctions allant des mécanismes de l'attention à l'apprentissage en passant par la mémoire (28).

Les voies cholinergiques ont un rôle dans les fonctions nécessitant l'appel à la mémoire dite de travail. C'est une mémoire à court-terme permettant le stockage temporaire d'informations pour la réalisation d'une tâche ou d'un raisonnement. Ce réseau neuronal fait intervenir le cortex préfrontal et les régions hippocampiques qui servent à intégrer des stimuli qu'ils soient familiers ou nouveaux. Une perte sélective des neurones innervant le cortex préfrontal suite à une lésion du cerveau antérieur basal chez le primate non-humain engendre une perturbation de la mémoire spatiale (29). Des études utilisant la scopolamine, un antagoniste de l'Ach, montrent également des perturbations dont l'altération de la reconnaissance visuelle, de la reconnaissance des mots et des images (30). Les projections présentes au niveau des aires visuelles et somatosensorielles participeraient donc au phénomène de discrimination sensorielle. Les aires stimulées sur le préfrontal et le cortex pariétal ont un rôle dans l'attention. La liste des fonctions citées précédemment est loin d'être exhaustive, l'implication des voies cholinergiques dans d'autres fonctions sont à l'étude.

3. Synthèse

La communication cellulaire dans le SN est assurée principalement par un processus nommé la transmission synaptique chimique (**Figure 4**). Cela consiste à la mise en place d'un complexe anatomo-fonctionnel mettant en jeu 3 acteurs principaux : un neurone présynaptique, une synapse et une cellule postsynaptique (nerveuse/glandulaire/musculaire). La synapse chimique est

un espace entre la cellule pré et post synaptique où les neurotransmetteurs seront libérés. Dans un premier temps, les neurotransmetteurs vont être synthétisés au niveau du neurone pré-synaptique et être encapsulés dans des vésicules de transports permettant leur adressage en direction de la fente synaptique. La libération du neurotransmetteur contenu dans les vésicules s'effectue alors via une exocytose. La membrane vésiculaire va fusionner avec la membrane plasmatique neuronale présynaptique pour permettre la libération du nt (31).

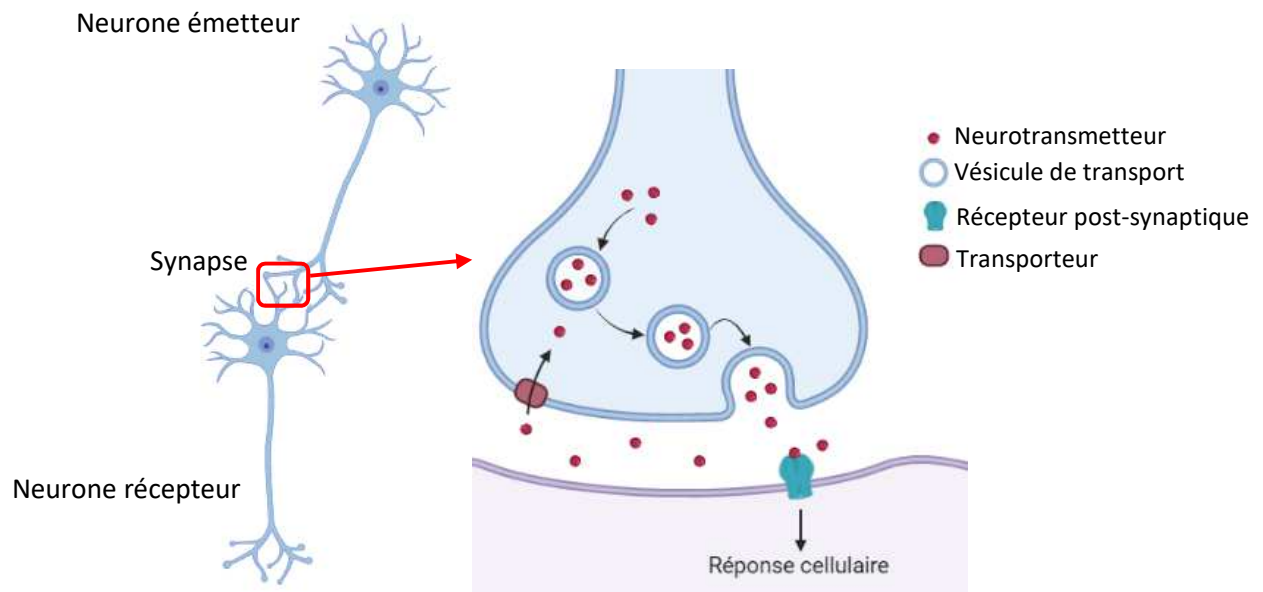


Figure 4: Schéma générale sur le fonctionnement de la transmission synaptique au sein du système nerveux.

La transmission synaptique est le moyen de communication entre les neurones. Le neurone émetteur du message dit présynaptique, va synthétiser des molécules messagères : les neurotransmetteurs (nt). Ces derniers seront envoyés au niveau de la synapse qui est un lieu d'échange virtuel non clos entre le neurone émetteur et le neurone récepteur. Le neurone récepteur va alors recueillir les nt au niveau de sa membrane plasmatique grâce à la présence de récepteurs ayant une affinité pour le nt synthétisé. Une fois le nt fixé sur son récepteur, s'en suit une réponse cellulaire appropriée à la stimulation.

Concernant la biosynthèse de l'acétylcholine, elle est assurée par une réaction enzymatique précise. Les deux réactifs permettant sa formation sont l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) provenant du métabolisme des glucides (via le cycle de Krebs) et la choline dont l'origine peut être variable (alimentaire ou endogène (glycine)/recapture). La choline acétyltransférase (ChAT) est l'enzyme qui va permettre le transfert du groupement acétyl sur la choline formant ainsi l'acétylcholine (Ach) (32) (Figure 5).

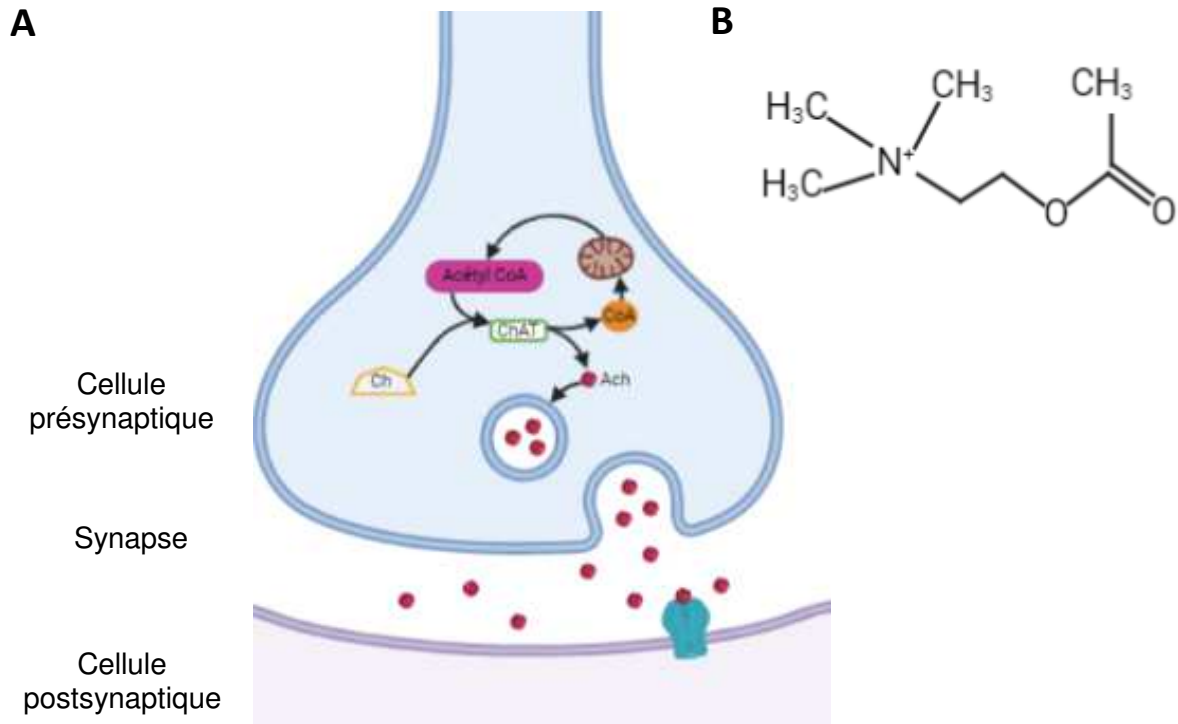


Figure 5 : Biosynthèse de l'acétylcholine

Voie de synthèse (A). L'acétylcholine (Ach) est synthétisée grâce au couplage de l'Acétyl-CoA et de la choline (Ch) par une enzyme la choline acétyl transférase (ChAT). Une fois synthétisée, l'Ach va se retrouver dans le cytosol du neurone présynaptique et va être internalisée dans des vésicules de transport afin d'être adressée à la fente synaptique pour agir sur des récepteurs qui lui sont spécifiques. Formule chimique de l'Ach (B).

Une fois synthétisée, elle sera stockée dans des vésicules de transport synaptiques en attendant sa libération au niveau de la fente synaptique.

4. Action sur des récepteurs spécifiques

Sa libération au niveau de ses sites d'action va permettre son interaction avec des récepteurs spécifiques regroupés en deux catégories : les récepteurs nicotiques (N) et les récepteurs muscariniques (M).

Les récepteurs nicotiques sont des récepteurs à canaux ioniques. Ils sont constitués de 5 sous-unités, ils sont alors qualifiés de pentamériques. Les sous-unités de ces récepteurs sont au nombre de 17 (α_1 à α_{10} ; β_1 à β_4 ; γ ; δ ; ϵ). Selon leur localisation, ils peuvent être divisés en 2 types : musculaire ou neuronaux. Les récepteurs N neuronaux sont situés sur les nerfs post-ganglionnaires, les neurones et les microglies (33). Les récepteurs N musculaires sont quant à eux

retrouvés au niveau de la jonction neuro-musculaire. L'assemblage des 5 sous-unités sera alors différente et les combinaisons sont multiples. Ils peuvent être composés d'homomères (même sous-unités) ou d'hétéromères (sous unités différentes). Les sites de fixation de l'Ach sont situés au niveau des sous unités α et β (34,35).

Une fois que l'acétylcholine va se fixer sur ces récepteurs nicotiques, ils vont entrer rapidement en configuration ouverte ce qui va permettre le passage de cations dans la cellule entraînant une dépolarisation locale engendrant ainsi une réponse cellulaire (**Figure 6**).

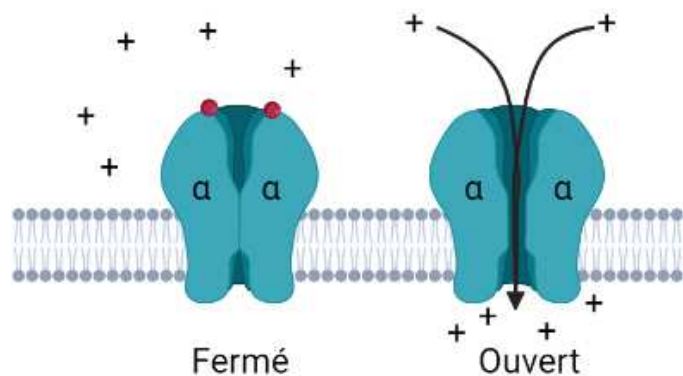


Figure 6 : Activation d'un récepteur nicotique

L'Ach (rond rouge) en se fixant sur les sites de fixation présents ici sur des sous-unités α va engendrer l'activation du récepteur canal permettant ainsi son ouverture pour laisser les cations (charges positives Na^+ ou Ca^{2+}) passer du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire.

Les récepteurs muscariniques quant à eux sont des récepteurs couplés aux protéines G trimérique, ils sont formés de 7 hélices transmembranaires. Il en existe cinq sous-types de M1 à M5. Ces différents sous-types sont retrouvés au niveau de divers organes (yeux, cœur, muscle lisse, cerveau etc.). L'expression cérébrale de ces récepteurs est région dépendante. Les types M1, M3 et M4 sont retrouvés dans les ganglions de la base et le cortex alors que les M2 et M5 sont préférentiellement situés au niveau de l'hippocampe (36). Selon leur sous-type, la voie cellulaire activée par l'action de la protéine G sera différente. Les effecteurs activés par la protéine G sont soit l'adénylate cyclase (voie de l'AMPc) soit la phospholipase C (voie PLC). Les messagers secondaires intracellulaires synthétisés par ces deux voies vont permettre une ouverture des canaux K^+ et une augmentation Ca^{2+} respectivement (**Figure 7**). Suivant la zone tissulaire d'activation de ces récepteurs, les fonctions biologiques qui en résultent seront différentes. Des études sur des modèles animaux génétiquement modifiés présentant un déficit de différents types de récepteurs muscariniques ont permis de déterminer le rôle des voies de signalisation suite à

l'activation de ces récepteurs. Par exemple une déplétion des récepteurs M2 et M4 provoque une dérégulation de l'homéostasie de l'acétylcholine au niveau hippocampique. Ces récepteurs sont donc indispensables à la régulation des taux d'Ach (37).

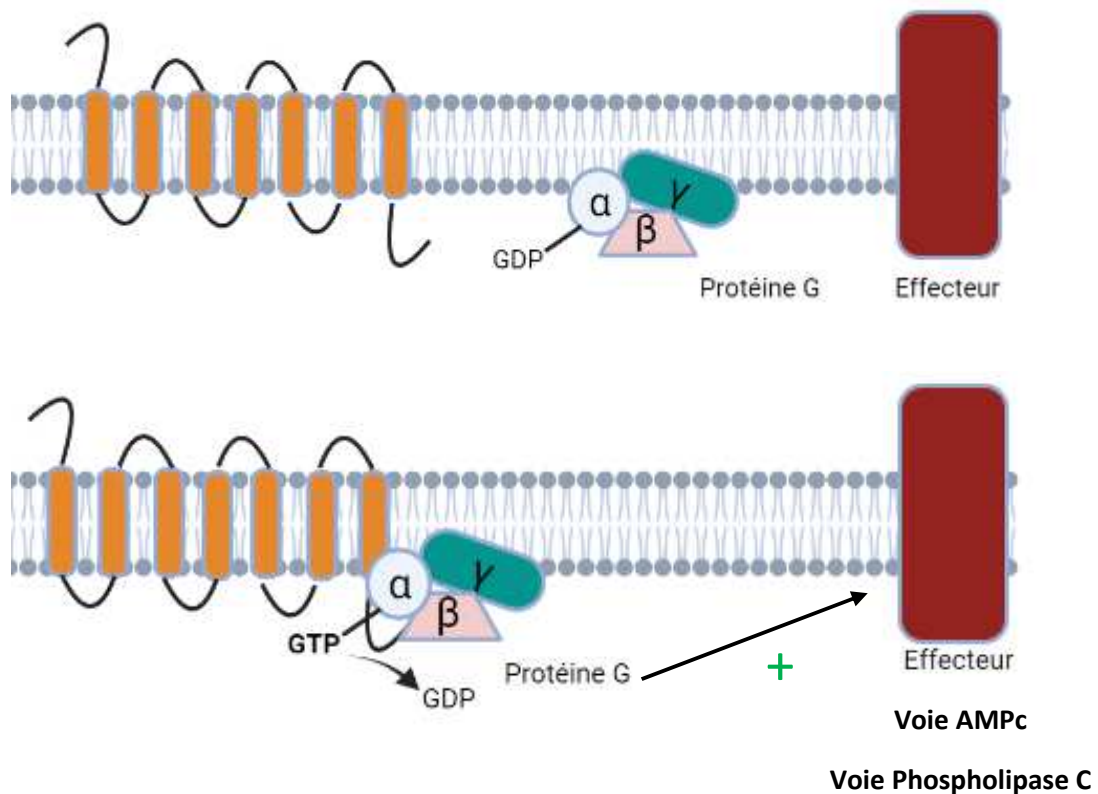


Figure 7: Activation d'un récepteur muscarinique

L'Ach en se fixant sur les récepteurs muscariniques va provoquer une cascade de signalisation cellulaire aboutissant à l'activation de divers effecteurs grâce à des messagers secondaires produits par deux voies principales (AMPc, Phospholipase C).

Une fois que l'Ach aura agi sur ses récepteurs elle pourra être dégradée.

5. Dégradation

Le clivage de l'Ach est assuré par une enzyme : l'acétylcholinestérase (AChE). C'est une enzyme soit plasmatique ou transmembranaire située en post synaptique (au niveau des synapses cholinergiques et/ou de la jonction neuromusculaires). Elle va permettre de catalyser l'hydrolyse de l'Ach au niveau de la fente synaptique afin d'y réguler sa concentration. Elle a un fort pouvoir catalytique allant jusqu'à la dégradation de 25000 molécules d'Ach par seconde (38). Des méthodes de cristallographie ont permis de déterminer la structure à l'échelle atomique de l'AChE (39). Le

site actif de l'enzyme est composé de trois résidus amino acides (Glutamate-Histidine-Sérine) communément appelé la triade catalytique située au fond d'une gorge de 20 angströms de profondeur. Des résidus aromatiques hydrophobes situés le long de la gorge vont permettre d'acheminer et d'orienter l'Ach au niveau de la triade catalytique. Au sein de cette dernière, on distingue deux sous-sites ayant des rôles différents (40). Un site anionique où une interaction électrostatique avec l'azote chargé positivement de l'Ach sera assurée par le glutamate chargé négativement permettant ainsi de stabiliser et de maintenir l'Ach. Un site estérasique est également présent où le résidu actif (la sérine) va pouvoir enclencher la réaction chimique responsable du clivage de l'Ach en acide acétique et en choline. Plus précisément, la sérine va se fixer sur le carbone de l'Ach et transférer son hydrogène vers le nt. L'atome d'oxygène de l'Ach va se fixer sur l'hydrogène de la sérine, la liaison intramoléculaire se rompt. A ce stade, l'acide acétique est encore fixé à la sérine mais la choline peut diffuser pour être évacuée de la gorge. Une molécule d'eau (H₂O) présente dans le milieu va finir la réaction en libérant l'acide acétique du résidu actif de l'enzyme (c'est-à-dire la sérine) (41). La libération de ces deux composants va permettre un retour à une configuration normale de la triade catalytique permettant ainsi le clivage de nouvelles molécules d'acétylcholine (**Figure 8**).

La choline diffusant librement après cette réaction sera recaptée par des transporteurs au niveau de la membrane présynaptique afin de permettre son intégration dans le cytosol pour être utilisée à nouveau pour la néo-synthèse du neurotransmetteur Ach.

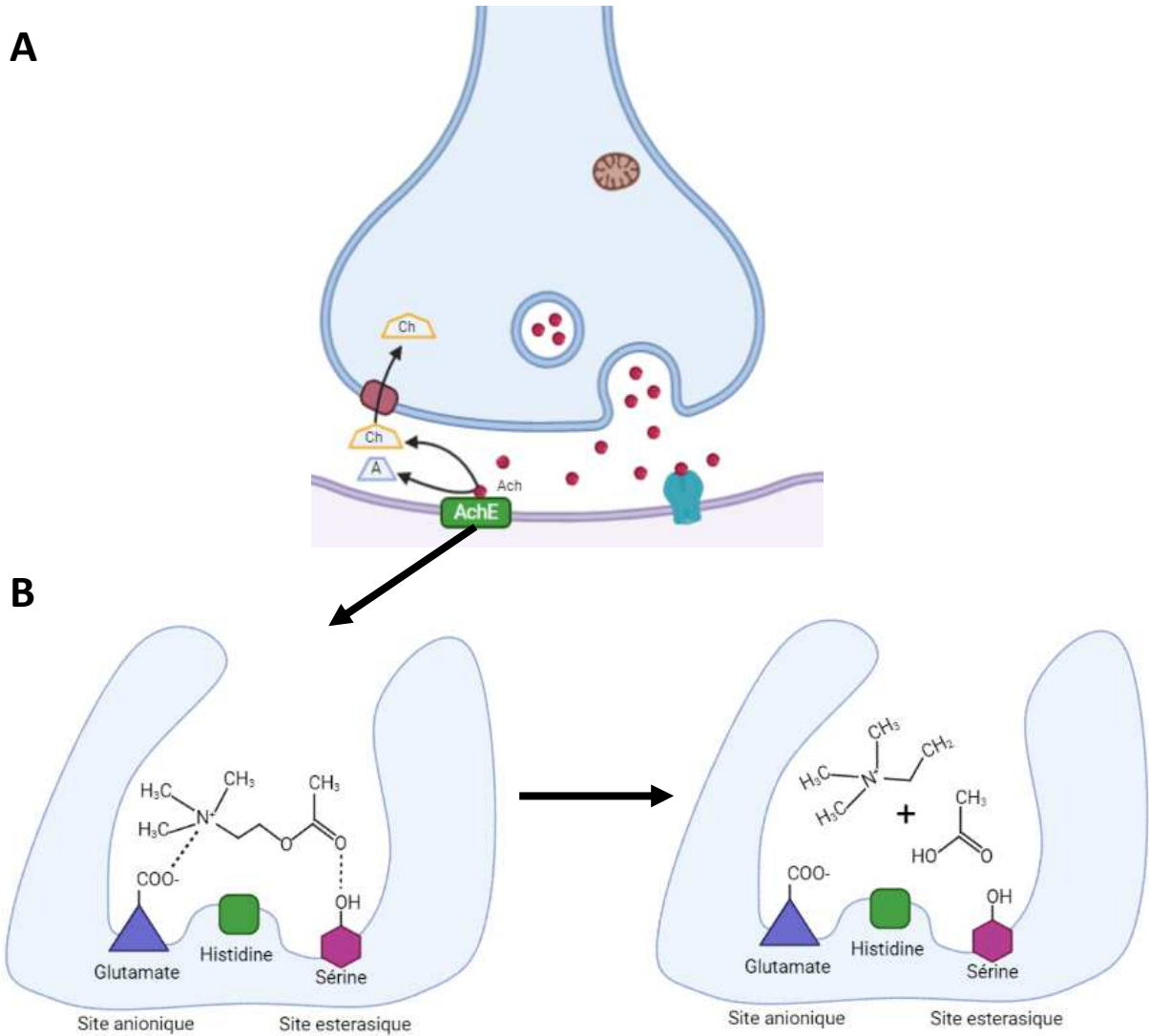


Figure 8: Processus de dégradation de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase

L'AChE située sur la membrane plasmique en postsynaptique va permettre l'hydrolyse de l'Ach (A). Zoom au niveau de la gorge de l'enzyme où se situe son site actif composé de la triade catalytique permettant la dégradation de l'Ach en choline et acide acétique (B).

III. Inhibiteurs des acétylcholinestérases

1. Classification

Les inhibiteurs enzymatiques peuvent agir de façon réversible ou irréversible sur leur cible. On parle d'inhibition irréversible quand l'inhibiteur se fixe au niveau du site actif de l'enzyme en formant une liaison covalente avec celle-ci. Dans ce cas, l'enzyme est inactivée et ne peut plus jouer son rôle au sein de l'organisme. L'inhibiteur est alors considéré comme un inactivateur (ex : sarin, soman, tabun). Il peut y avoir aussi des inhibitions dites réversibles, dans cette configuration l'inhibiteur va créer des liaisons non covalentes (ex : liaisons de Van der Waals, liaisons hydrophobes, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, liaisons dipôle-dipôle, transfert de charge, liaisons ion-dipôle) (ex : Pyridostigmine, Physostigmine, Donépézil). Ce type de liaisons a pour conséquence de modifier les structures tertiaires et/ou quaternaires des enzymes pour empêcher le bon fonctionnement de celle-ci : on parle de régulation allostérique (**Figure 9**).

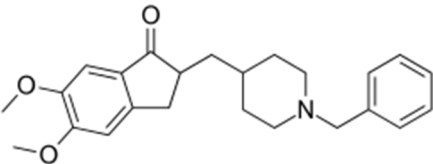
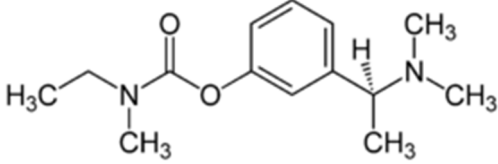
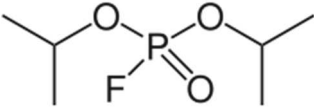
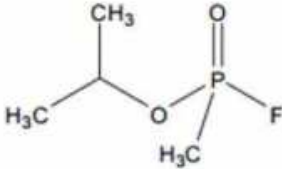
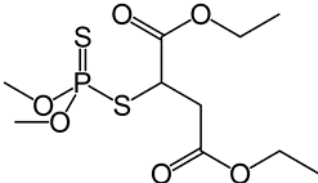
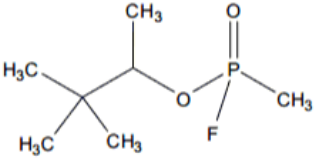
Inhibiteurs Réversibles	
Donépézil 	Rivastigmine 
Inhibiteurs Irréversibles	
Organophosphorés (OP)	
<i>Insecticides</i>	<i>Neurotoxiques de guerres</i>
Diisopropyl fluorophosphate (DFP) 	Sarin 
Malathion 	Soman 

Figure 9: Exemples d'inhibiteurs des acétylcholinestérases.

2. Mode d'action

a. Inhibition réversible : exemple du Donépézil

Le Donépézil (DPZ) est un inhibiteur réversible de l'AChE qui est constitué de trois parties distinctes (diméthoxyindanone, pipéridine, cycle benzyle) (**Figure 10**). Des simulations d'encastrement (docking) effectuées sur le DPZ et ses analogues ont montré que ces inhibiteurs ne se liaient pas à la triade catalytique du site actif de l'enzyme (42). Par contre le DPZ peut se lier à la fois aux conformations actives et inactives de l'enzyme. Il va interagir avec les différents acides aminés aromatiques retrouvés le long de la gorge. Les anneaux de chaque segment de la molécule ont des interactions spécifiques au sein du site de liaison de l'AChE. Le tryptophane en position 84 (Trp84) de l'AChE va être impliqué dans une interaction d'empilement π - π parallèle. Dans le segment central du DPZ, le cycle pipéridine avec un azote chargé va entrer en interaction avec l'acide aminé Phénylalanine 330. Au niveau de la dernière partie, une interaction π - π entre l'anneau du diméthoxyindanone et l'anneau du Trp279 de l'AChE se produit. De plus des interactions avec les molécules présentes dans le milieu ainsi que des interactions de van der Waals vont permettre de stabiliser le DPZ au sein de la gorge de l'AChE (43,44).

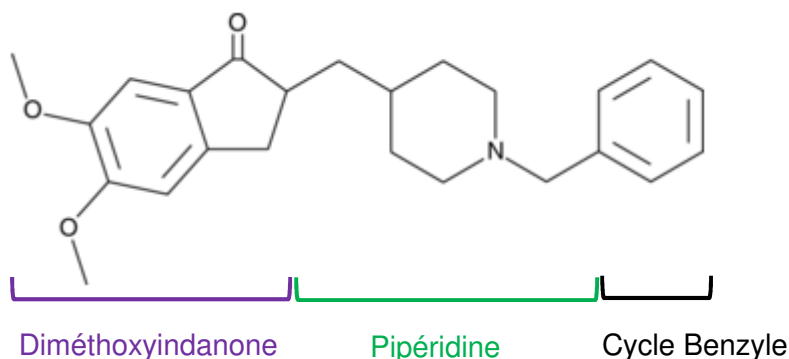


Figure 10: Structure du Donépézil : inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase.

b. Inhibition irréversible : exemple des organophosphorés

Une inhibition irréversible de l'AChE peut également avoir lieu par une certaines classe de composants les organophosphorés (OP) rendant ainsi l'AChE inactive.

L'atome de phosphore de l'OP va subir une attaque nucléophile par l'atome d'oxygène de la sérine. Une liaison alors partielle s'établit entre les deux atomes. A ce stade, l'AChE est bloquée mais elle peut retourner à son état d'origine suite à l'interaction d'une molécule d'eau au niveau de

la liaison P-O encore réversible (processus lent) (**Figure 11.A**). Par contre, après un certain laps de temps les molécules d'eau peuvent également interagir avec le groupement R qui va alors partir spontanément mettant l'OP dans une configuration géométrique tétraédrique d'une grande stabilité. La liaison entre le phosphate et l'oxygène de la serine devient alors irréversible, il est impossible que l'enzyme retrouve son état initial : c'est le phénomène d'aging (45) (**Figure 11.B**).

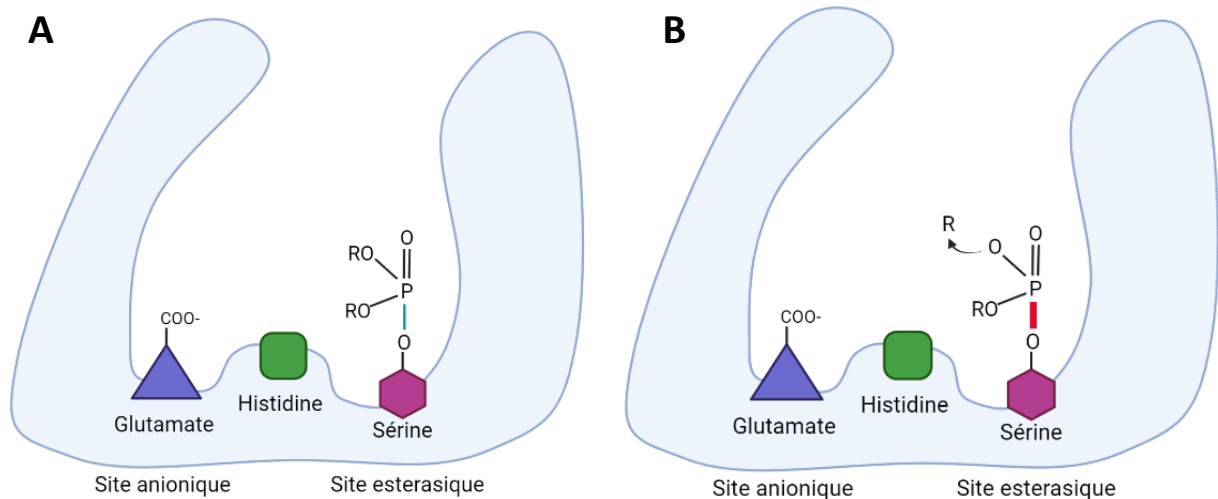


Figure 11: Inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase par un organophosphoré.

Blocage de l'AChE suite à la fixation de l'OP (A). Dans cette configuration l'AChE reste encore réactivable. Si le groupement R se détache au bout d'un certain temps, l'AChE est impossible à réactiver, c'est le phénomène d'aging (B).

3. Contexte d'utilisation des inhibiteurs d'acétylcholinestérase

a. Agriculture/ Armes chimiques

Les organophosphorés (OPs), composés hautement toxiques, sont catégorisés en deux grandes familles : les pesticides (OPPs) et les agents neurotoxiques de guerre (NOPs). Les OPs constituent une classe hétérogène de composés avec des propriétés physico-chimiques qui sont spécifiques à chaque molécule. Les OPs partagent un mécanisme de toxicité en commun qui est l'inhibition quasi-irréversible des cholinestérase. Ils sont utilisés dans divers contextes, leur fort pouvoir neurotoxique étant leur principale caractéristique. En effet, ils sont utilisés à la fois en tant que pesticides ou neurotoxiques de guerre. Malgré le contexte d'utilisation qui diffère, le mécanisme d'action sur le SNC et SNP est le même via l'inhibition des acétylcholinestérase que ce

soit au niveau synaptique et/ou globulaire. La majorité des OPs sont des molécules inodores et incolores.

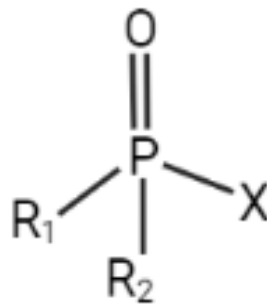


Figure 12: Structure chimique générale d'un organophosphoré

Les OPs sont des esters ou des thiols dérivés de l'acide phosphorique, phosphonique, phosphinique ou phosphoramidique. Les groupements R₁ et R₂ sont des alkyles directement reliés à l'atome de phosphore ou via l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. L'atome doublement lié au phosphore peut être soit de l'oxygène ou du soufre. Le groupement -X est également lié à l'atome de phosphore par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène ou de soufre. Le groupe X peut être composé d'une gamme assez hétérogène de fonctions chimiques (groupes halogènes, aliphatiques, aromatiques ou hétérocycliques). C'est ce groupement qui va être libéré lors de la fixation de l'OP au niveau de l'AChE (46) (**Figure 12**).

En France, les produits phytosanitaires tel que les pesticides sont largement utilisés dans le domaine de l'agriculture. Leur pouvoir neurotoxique est très efficace sur les insectes pouvant être nuisibles aux cultures. Le parathion a été le premier composé OP à être utilisé dès 1944 (47). Il a été largement diffusé dans le monde suite aux interdictions sur l'utilisation des premiers pesticides dits organochlorés. Même si les OPPs sont encore utilisés de nos jours, des évolutions réglementaires ont permis de réduire leur utilisation en prenant en compte leurs effets toxiques notamment chez l'Homme (48). En prenant en compte ces considérations, le parathion a été interdit d'utilisation en France à partir de 2003. Cependant d'autres pesticides OPs sont encore utilisés (Chlorpyrifos - Diméthoate - Malathion) mais les autorisations d'utilisation sont très réglementées.

Les OPs sont également utilisés comme neurotoxiques de guerre (NOPs). Les prémices du développement de l'arme chimique sont apparus dès le premier conflit mondial. La première arme chimique à être utilisée en 1917 a été le gaz moutarde (sulfure d'éthyle dichloré) avec ses

propriétés asphyxiantes. Ces armes chimiques ont été développées dans le but d'atteindre les ennemis quand les autres types d'armes étaient jugées inefficaces (guerre de tranchées).

La mise au point des neurotoxiques de guerres dérivés des OPs s'effectua plus tard avant la seconde guerre mondiale. La découverte de ces agents chimiques OPs a été possible via les travaux du docteur Gerhard Schrader de la firme allemande I.G Farben en 1936. Le tabun fut le premier neurotoxique militarisé par l'Allemagne nazi. Puis d'autres substances neurotoxiques ont été développées comme le sarin et le soman en 1939 et 1944 respectivement. A titre comparatif le sarin est 6 fois plus toxique que le tabun, et le soman 2 fois plus toxique que le sarin.

Une nomenclature américaine a été mise au point pour classer ces neurotoxiques. Il en existe deux grandes classes les agents neurotoxiques dits G pour « German agent » (tabun, sarin, soman, cyclosarin) et les agents dits V pour « Venomous » (VX, VR : VX russe) synthétisés par la Grande Bretagne dans les années 1950. Les agents V sont plus stables et jusqu'à 100 fois plus toxiques que les agents G (49). Plus récemment, une autre classe dénommée « Novitchok » fut développée dans les années 1990 par la Russie (50). Les NOPs présentent des caractéristiques communes, ce sont des liquides clairs incolores et inodores avec une pénétration rapide au niveau de la peau. Selon leurs classes, ils sont soit volatils comme les agents G ou non volatils comme les agents V.

Suite au développement et à l'avancée de l'industrie chimique, leur utilisation a été démontrée lors de conflits militaires notamment lors de la guerre Iran-Irak. Lors de la guerre du Golfe qui opposa l'Irak à une coalition de 35 états dirigée par les Etats-Unis, les militaires ont été exposés au sarin et cyclosarin suite au bombardement d'arsenaux militaires irakiens. Quelques années post-conflit, les vétérans ont développé une multitude de symptômes regroupés sous le nom de syndrome de la guerre du Golfe. Ces observations cliniques ont montré qu'une exposition à des armes chimiques pourrait être en partie responsable des séquelles retrouvées chez les militaires (51). Lors de conflits armés, les militaires déployés sur le terrain peuvent être largement exposés à ces menaces chimiques.

Cependant, l'utilisation de telles molécules ne se limite pas à la population militaire. En effet, au XX-ème et XXI-ème siècle les menaces chimiques se retrouvent de plus en plus présentes pour les populations civiles suite à des contextes sociaux économiques complexes. Diverses utilisations récentes nous le soulignent. En 1995, des membres de la secte nippone « aum verite supreme avany » ont orchestré un attentat terroriste dans le métro de Tokyo faisant de nombreuses victimes suite à une exposition au gaz sarin (52). En 2013, le gouvernement syrien a organisé une attaque aérienne au sarin dans la province d'Idleb au nord-ouest de la Syrie faisant

1429 morts (53). En 2017, le VX a été utilisé dans un aéroport pour assassiner Kim Jong Nam, le demi-frère du dirigeant nord-coréen Kim Jong-un en Malaisie (54). Dernièrement en 2018, de nouveaux agents neurotoxiques les « Novitchok », neurotoxiques de quatrième génération sous forme de poudre ultrafine ou d'huile ont été utilisés sur un ex-agent russe Sergueï Skripal et sa fille, et affectant deux britanniques quatre mois après le premier empoisonnement (55), et encore plus récemment dans la tentative d'assassinat de l'opposant russe Alexei Navalny (56).

Malgré les interdictions, leurs utilisations à plusieurs reprises démontrent que ces agents neurotoxiques sont une menace chimique toujours actuelle que ce soit pour les populations militaires ou civiles.

Tous les OPs sont considérés comme létaux à des degrés différents. Les NOPs présentent une toxicité aiguë supérieure à celle des OPPs. Chaque composé est caractérisé par une dose létale 50 (DL50). C'est la dose de toxique administrée en une seule fois qui va provoquer la mort de 50% des individus au cours des 24h suivant l'administration de la substance. C'est une mesure quantitative qui renseigne de la toxicité d'un produit. L'évaluation de la DL50 dépend de l'organisme et des voies d'administrations. En effet, plus l'organisme est de taille importante, plus les cibles sont nombreuses et dispersés dans l'organisme. La quantité d'OPs nécessaire à une inhibition responsable de l'apparition de symptômes sera alors plus importante. Afin de permettre une classification de la toxicité des composants selon leur DL50, il est alors nécessaire d'évaluer chez une même espèce les diverses molécules chimiques ainsi que les différentes voies d'administration.

Une étude chez le rat a évalué la toxicité de différents OPs qu'ils soient considérés comme NOPs (tabun, sarin, soman, VX) ou faisant parti de la classe des OPPs (paraoxon (POX) et diisopropyl fluorophosphate (DFP) suivant diverses voies d'administration (intra-musculaire, intrapéritonéale, par inhalation, sous-cutanée). Ils ont démontré que l'administration intra-musculaire était la plus toxique quel que soit l'agent neurotoxique, et que la molécule présentant le plus de toxicité était le VX avec une DL50 de 0,0082 mg/kg comparé à la moins toxique le DFP avec une DL50 de 1,399mg/kg (57). La toxicité de ces OPs chez l'Homme est compliquée à définir, même si les données précliniques sur des modèles animaux ne sont pas directement transposables chez l'homme cela nous apporte de précieuses informations sur le potentiel toxique des différentes molécules.

Dans un contexte sain sans pathologie préexistante a priori, les taux d'Ach sont régulés via l'action des AChE. La dégradation des neurotransmetteurs Ach et leur recyclage permet de maintenir des taux normaux constants permettant un bon fonctionnement du système nerveux.

L'utilisation des inhibiteurs des AChE empêche la dégradation des molécules d'Ach ce qui entraîne une accumulation anormalement élevée de ce neurotransmetteur au sein du SN sans autorégulation possible. La présence en excès du neurotransmetteur Ach engendre une hyperstimulation du système cholinergique via l'activation incontrôlée des récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiques). L'hyperexcitabilité du SNC et du SNP conduit à l'apparition d'une succession de symptômes caractéristiques. Dans ce contexte, les OPs engendrent une intoxication (Figure 13) (58).

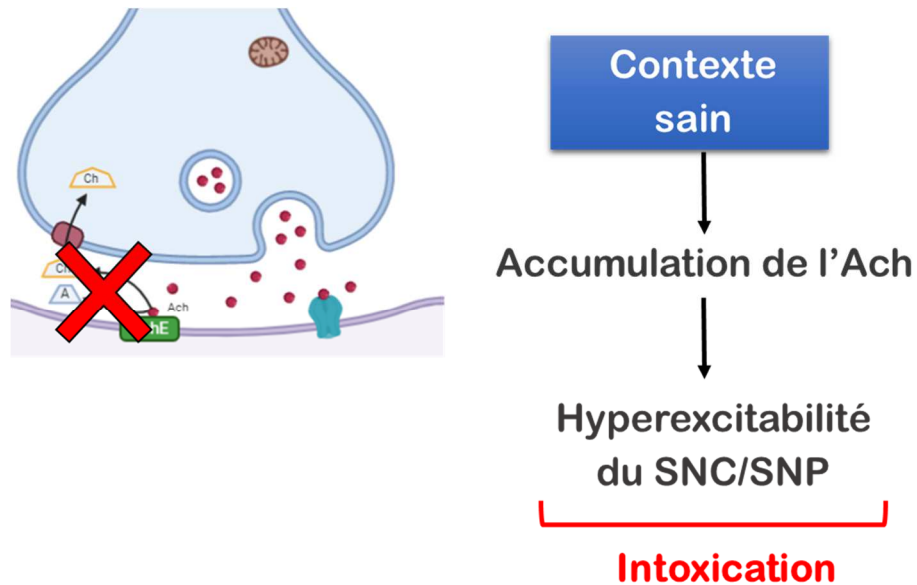


Figure 13: Conséquences des inhibiteurs des AChE dans un contexte sain.

L'inactivation des AChE provoque une accumulation anormale de l'Ach au sein du système nerveux. L'activation en masse des récepteurs nicotiques/muscariniques provoquent une hyperexcitabilité du système nerveux engendrant divers troubles physiologiques. Les inhibiteurs sont à l'origine d'une intoxication dans ce contexte.

Au vu de l'utilisation des OPs à travers les siècles, des études scientifiques ont été menées pour étudier les effets de ces derniers à court et à long terme (voir Etude 1).

b. En thérapie

Des inhibiteurs réversibles des AChE sont également utilisés dans un contexte thérapeutique pour contrecarrer la perte d'Ach dans diverses pathologies. Ils vont permettre de maintenir un niveau d'Ach dans les fentes synaptiques ainsi que le prolongement de la durée d'action de ce nt (Figure 14).

Les inhibiteurs réversibles des AChE sont utilisés dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (MA) reconnue pour présenter des troubles cholinergiques (MA) (59). Le premier utilisé était la tacrine qui a été approuvé dans les années 1990 par la Food and Drug Administration (FDA). Ce composé présentait une certaine toxicité hépatique (60), de ce fait une seconde génération d'inhibiteurs a été développée et adoptée pour le traitement symptomatique de la MA comme le Donépézil, la rivastigmine et la galantamine. Des inhibiteurs réversibles (carbamates ex : Physostigmine) sont prescrits dans une autre pathologie qui est la myasthénie grave. C'est une maladie auto-immune caractérisée par une dégradation de la jonction neuro-musculaire. Ces inhibiteurs de l'AChE augmentent ainsi la quantité d'Ach disponible et facilitent l'activation et la contraction musculaire (61).

Les inhibiteurs irréversibles peuvent également être utilisés en thérapie ophtalmologique dans le traitement du glaucome via une application locale. Le glaucome est du à une augmentation de la pression intra-oculaire conduisant à une atteinte du nerf optique induisant des dommages visuels menant jusqu'à une perte totale de la vision si ce n'est pas traité à temps. Le DFP a été utilisé pour diminuer la tension intraoculaire (62).

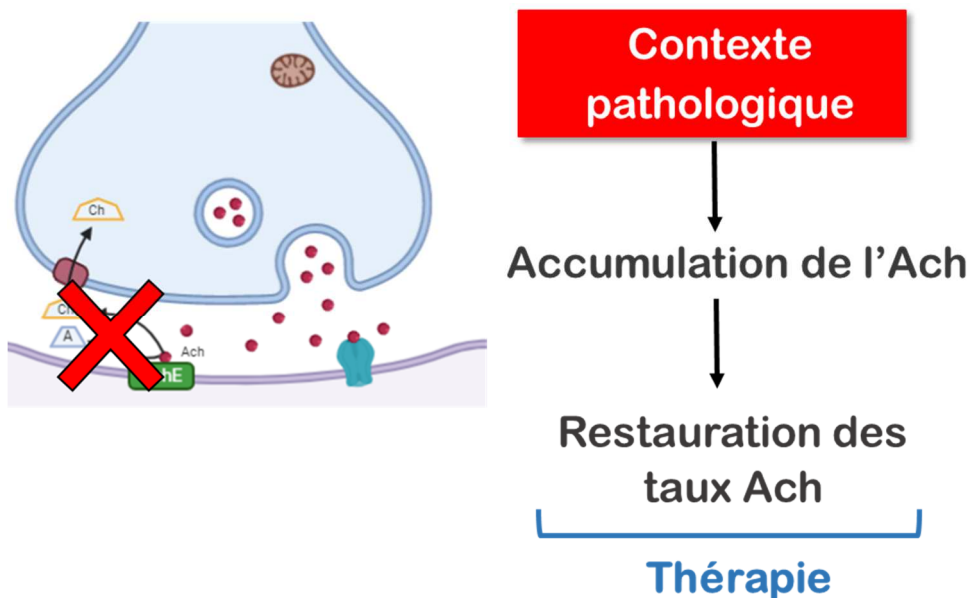


Figure 14: Conséquences des inhibiteurs des AChE dans un contexte pathologique.

En conditions pathologiques, des modifications des taux d'Ach peuvent avoir lieu notamment un déficit. Pour pallier à cette baisse des inhibiteurs réversibles/irréversibles peuvent être utilisés pour restaurer des taux d'Ach acceptable pour maintenir le fonctionnement du SN. Ils agissent alors comme des agents thérapeutiques.

Que ce soit lors d'une intoxication ou d'une thérapie les inhibiteurs réversibles ou irréversibles ont des effets directs sur leur cible l'ACHé. Cependant les modifications fonctionnelles du système cholinergique entraînent une cascade de processus biologiques qui vont avoir des répercussions indirectes sur divers mécanismes cellulaires (inflammation, consommation cérébrale de glucose etc.). Il est alors primordial de se munir d'outils permettant la visualisation *in vivo* de ces mécanismes. Pour cela, des techniques d'imagerie *in vivo* ont été développées.

IMAGERIE MÉDICALE *in vivo*

En imagerie, diverses techniques non-invasives ont été développées afin d'explorer in fine l'intérieur du corps humain. Ces modalités d'imagerie suite à un processus d'acquisition et de traitement de données sont capables de donner une représentation précise de divers phénomènes biologiques. La technique « idéale » devrait allier à la fois une bonne résolution spatiale et temporelle. Cependant, chaque type d'imagerie présente des avantages mais aussi des limites car ils se basent sur des propriétés physico-chimiques différentes. Dans ce sens, les systèmes d'imagerie actuels se complètent afin d'étudier au mieux l'organisme dans sa globalité et de faire progresser nos connaissances sur son fonctionnement (63). L'utilisation de plusieurs techniques d'imagerie est regroupée sous le terme d'imagerie multimodale. Suivant le type d'imagerie utilisé, on peut décomposer leur contribution en deux grandes parties : les aspects dits structurels et les aspects dits fonctionnels.

D'un côté, l'imagerie dite structurelle fait appel aux technologies à rayons X (scanner) et à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). En effet, elle donne accès à des données anatomiques/morphologiques. Le scanner se base sur l'étude de l'atténuation de l'énergie des rayons X par les tissus afin d'obtenir une image. L'IRM quant à elle, utilise les propriétés magnétiques des molécules d'eau au sein des tissus. C'est la mesure de l'aimantation résultante en chaque point des tissus (eau immobile) qui sera extraite et analysée afin de déterminer la structure tissulaire (64).

Pour avoir une approche cette fois-ci fonctionnelle et permettre notamment l'évaluation/la quantification de manière non invasive *in vivo* des phénomènes biochimiques et/ou physiologiques, des méthodes d'imagerie comme l'IRM fonctionnelle ou la tomographie par émission de positons (TEP) sont utilisées (65). Au niveau cérébral, l'activité des populations neuronales va entraîner localement une surconsommation d'O₂, une augmentation du débit sanguin ainsi qu'une augmentation du métabolisme du glucose. Grâce à l'IRM fonctionnelle, le suivi de l'hémoglobine déoxygénée par la perturbation du champ magnétique des molécules d'eau va permettre de déterminer les régions cérébrales activées fortes consommatrices d'oxygène (66). La TEP quant à elle peut détecter la consommation de glucose *in vivo* mais elle ne se cantonne pas uniquement à ce type de mesures même si cela reste sa plus grande application. Elle permet l'exploration de diverses cibles au sein de l'organisme.

Ces techniques d'imagerie sont utilisables à la fois en conditions physiologiques mais aussi et surtout en conditions pathologiques. Elles procurent une grande valeur ajoutée d'un point de vue diagnostic et peuvent assurer le suivi de l'évolution d'une pathologie avec ou sans thérapie.

I. Tomographie par émission de positons (TEP)

1. Principe *in vivo*

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire qui utilise des radiotraceurs qui sont des molécules (appelées aussi traceurs) marquées par un isotope émetteur de positons. Le développement de radiotraceur pouvant se fixer à des molécules d'intérêt (ex : neurotransmetteur, protéines...) est primordial pour la compréhension et l'étude du rôle de la molécule ciblée au sein de l'organisme. En se basant sur la quantification de la radioactivité, on peut déterminer l'évolution de la concentration du radiotraceur dans les différentes régions corporelles. Cette analyse va permettre de suivre sa cinétique au sein de l'organisme et de cartographier la distribution spatiale de son accumulation, mais aussi et surtout de quantifier la distribution de la molécule cible.

La TEP nous fournit des informations fonctionnelles et quantitatives, cependant elle ne permet pas d'avoir accès aux détails anatomiques. Pour pallier cela la plupart des examens TEP sont combinés avec un scanner à rayons X nous procurant des vues anatomiques pour un repère anatomique **(Figure 15)**.

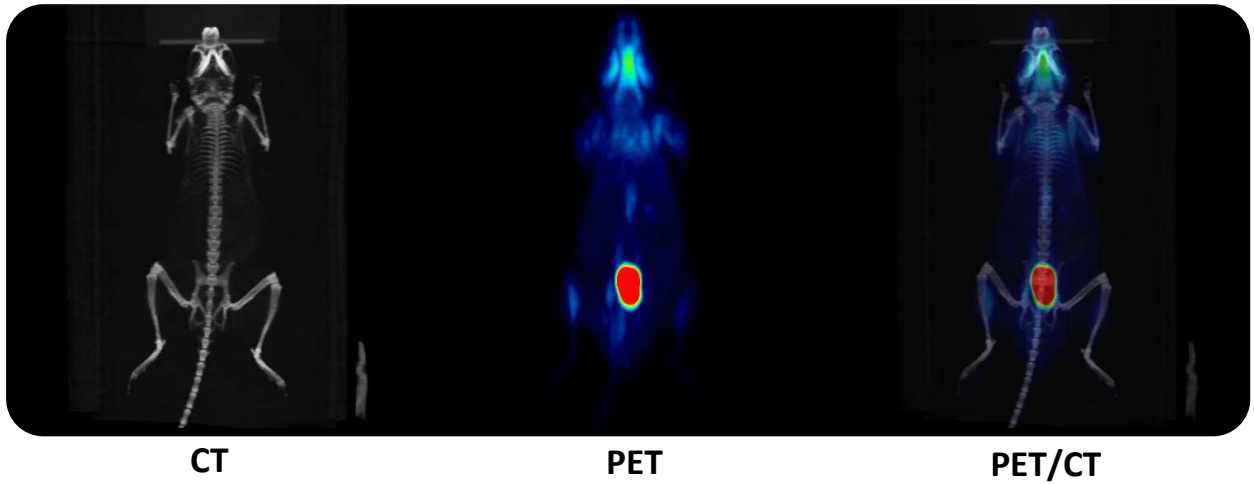
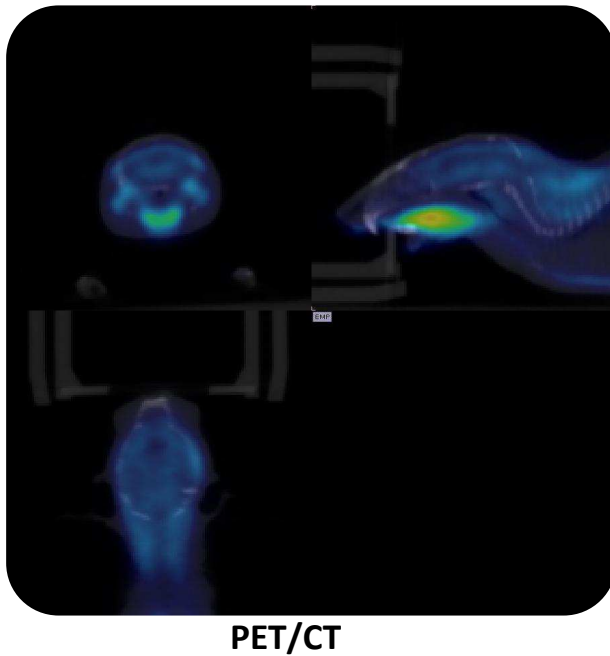
A**B**

Figure 15: Examen murin utilisant le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

Images CT et TEP corps entier d'une souris ayant reçu une dose de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, puis images représentant la fusion des images CT et TEP (A). Le CT grâce à la technologie rayons X permet d'avoir une vue anatomique alors que l'image TEP permet d'obtenir des informations fonctionnelles ici la consommation de glucose via l'utilisation du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. En B est présenté un zoom au niveau de la région cérébrale, sur le CT on voit très clairement la délimitation de la boîte crânienne et la TEP nous donne une information sur le métabolisme du glucose au sein de cette région.

2. Radiochimie : couplage de l'isotope radioactif avec le traceur

Un radiotracteur ou radiopharmaceutique est composé à la fois d'un traceur et d'un radioisotope. Le traceur est choisi pour sa bonne affinité pour une cible biologique définie, on l'appelle aussi ligand. Les isotopes radioactifs sont produits grâce à un accélérateur circulaire de particules (le cyclotron). La formation des isotopes radioactifs est assurée par le bombardement de particules chargées sur une cible. Les isotopes les plus couramment utilisés pour l'imagerie TEP sont le carbone-11 et le fluor-18. Leur période est de 20 min et de 110 min respectivement, ceci correspond au temps nécessaire pour qu'ils perdent la moitié de leur radioactivité. La brièveté de la période permet de limiter le temps d'exposition aux rayonnements pour le patient. L'inconvénient est la nécessité de disposer d'un cyclotron à proximité pour permettre la production et l'utilisation de ces isotopes directement sur place. Une fois l'isotope produit, il va être couplé au ligand spécifique par une réaction radiochimique spécialement mise au point pour aboutir à la production du radiotracteur. Cette opération doit être réalisée dans des enceintes fermées et blindées.

Le radiotracteur doit présenter plusieurs caractéristiques pour que son utilisation soit pertinente. Le marquage radiochimique entre l'isotope et le ligand ne doit pas modifier le site actif de la molécule par lequel s'effectuera la liaison avec la cible. Le traceur doit présenter à la fois une bonne affinité pour sa cible ainsi qu'une bonne spécificité. Les sites de fixation non spécifique ne doivent pas être nombreux afin d'avoir un bon ratio signal/bruit. Le métabolisme du radiotracteur ne doit pas être trop rapide pour permettre une bonne visualisation des sites de fixations. De plus, le radiotracteur ne doit pas être toxique d'un point de vue biologique même s'il est injecté à très faible dose (dose traceuse, quelques μg en général).

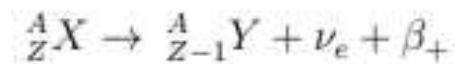
Dans le cas particulier de l'imagerie cérébrale, le radiotracteur doit posséder d'autres caractéristiques primordiales pour lui permettre de franchir la BHE : être de petite taille (400-600 Da) et être assez lipophile. Il ne doit pas être le substrat des transporteurs d'efflux de la BHE. De plus, les potentiels radiométabolites suite au métabolisme du radiotracteur au sein de l'organisme ne doivent pas ou peu passer la BHE pour ne pas participer à la fixation non-spécifique. Une faible fixation aux protéines plasmatiques est à privilégier car seule la fraction libre pourra franchir la BHE (67,68).

Un radiotracteur de bonne qualité doit avoir une multitude de caractéristiques physicochimiques permettant son utilisation *in vivo*.

3. Injection du radiotraceur et réaction nucléaire associée

L'injection du radiotraceur dans la majorité des cas (clinique/préclinique) se fait par voie intraveineuse pour permettre sa distribution dans l'ensemble de l'organisme. Les isotopes intégrés à la molécule (traceuse) sont radioactifs et donc instables. Pour permettre un retour à leur stabilité une désintégration spontanée va avoir lieu. Les isotopes ^{11}C (carbone) et ^{18}F (fluor) sont les plus utilisés en TEP et présentent une radioactivité β^+ .

L'équation d'une désintégration β^+ se présente ainsi :



X étant le radioélément père avec A son nombre de nucléons et Z son nombre de protons. Suite à la désintégration de l'élément X, on obtient Y l'élément produit, ν_e le neutrino et la particule émise β^+ .

Cela signifie que le noyau de l'élément père a un excès de protons. La désintégration va permettre la libération d'un positon et d'un neutrino. Le positon émis va parcourir une faible distance afin de réagir avec un électron à proximité du site de désintégration. La collision entre ces deux particules va entraîner une réaction d'annihilation. Cette dernière va générer deux photons gamma de même énergie 511 keV, se dirigeant en sens opposé avec un angle d'émission de 180° (**Figure 16**).

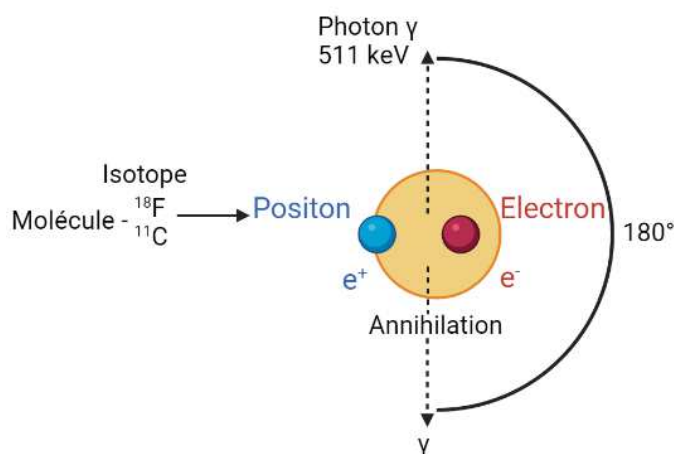


Figure 16: Réaction d'annihilation entre deux antiparticules

L'émission d'un positon par l'isotope radioactif pour retrouver sa stabilité va provoquer une réaction d'annihilation avec un électron à proximité. Cette réaction va générer 2 photons γ d'une énergie de 511 keV.

4. La détection

Les deux photons gamma vont alors atteindre simultanément une paire de détecteurs. Si les photons gamma atteignent en même temps des détecteurs diamétralement opposés, on se situe dans le cas de coïncidences vraies c'est-à-dire que ces 2 photons proviennent de la même réaction d'annihilation. La détection en coïncidence des 2 photons gamma par les détecteurs va permettre de retrouver le site de désintégration initial au sein du tissu et ainsi de localiser la molécule cible (**Figure 17**).

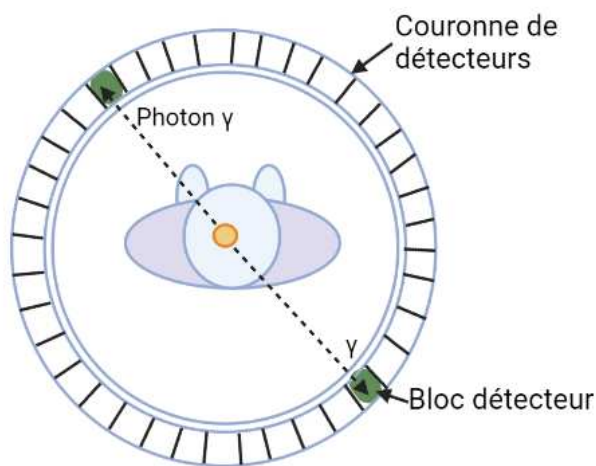


Figure 17: Schéma de détection des photons gamma émis.

La couronne de détecteurs de l'imageur TEP va recevoir une multitude de photons gamma provenant des multiples réactions d'annihilation au sein de l'organisme. La détection simultanée de deux photons permettra de déterminer leur site de désintégration.

5. Reconstruction

Les algorithmes de reconstruction permettent de construire une carte de la distribution d'activité tridimensionnelle du radiotracer à partir des projections 2D mesurées. Ils vont prendre en compte les erreurs (coïncidences diffusées ou fortuites) et l'atténuation des tissus. L'amélioration des algorithmes via des axes de recherche permet d'améliorer la qualité des images.

II. Radiotraceurs utilisés

1. Pour suivre le métabolisme du glucose : le 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose

Le 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) est un analogue du glucose dont un des groupements hydroxyles a été remplacé par un élément Fluor 18. Il permet d'imager *in vivo* les cellules consommatrices de glucose. En effet, son entrée dans les cellules se fait de la même façon que son analogue le glucose via une diffusion facilitée mettant en jeu des transporteurs protéiques spécifiques (les GLUT). Le glucose va alors être phosphorylé (G6P) par l'enzyme hexokinase (HK) puis dégradé pour permettre la formation de molécules riches en énergie via la voie de la glycolyse. Ces molécules vont pouvoir être internalisées dans les mitochondries pour être substrat du cycle de Krebs. Cependant contrairement au glucose, une fois que le [¹⁸F]FDG est présent dans la cellule, il va également subir une phosphorylation et devient le [¹⁸F]FDG6P. Par contre l'absence du groupement hydroxyle va empêcher son isomérisation en fructose empêchant ainsi sa dégradation (**Figure 18**) (69). Le [¹⁸F]FDG6P sera alors piégé dans la cellule. Il subira une désintégration pour pouvoir ensuite être métabolisé et éliminé par la cellule.

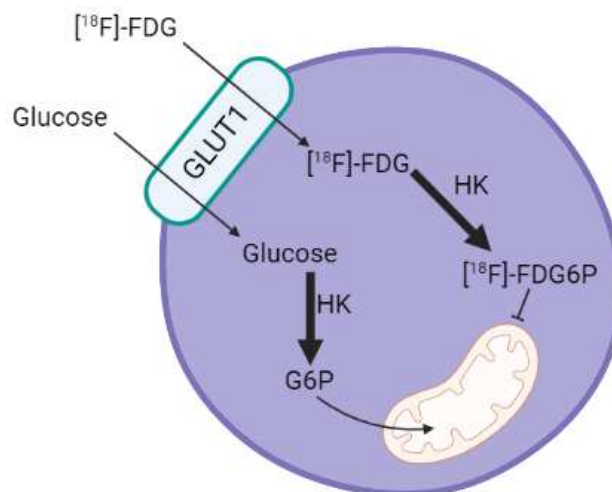


Figure 18: [¹⁸F]FDG dans la cellule.

Le [¹⁸F]FDG va être phosphorylé par une enzyme l'hexokinase. Cette phosphorylation va empêcher sa dégradation et il restera piégé dans la cellule contrairement au glucose.

C'est le radiopharmaceutique le plus utilisé notamment en oncologie (70). En effet, les cellules cancéreuses sont très demandeuses en énergie d'où l'augmentation de leur consommation de glucose. Par exemple, dans le cas des lymphomes cérébraux primaires ils

présentent une forte fixation du [^{18}F]FDG qui est corrélée à la taille de la tumeur (**Figure 19**) (71). Cependant, même si les transporteurs GLUT1 et l'activité de l'hexokinase sont augmentés au niveau des cellules cancéreuses, la fixation du FDG n'est pas spécifique (72). La consommation de glucose est effectuée par une diversité de populations cellulaires (cellules tumorales, immunitaires, neuronales...). Dans les études en neuroimagerie, grâce au [^{18}F]FDG plusieurs processus peuvent être mis en évidence comme la croissance ou l'envahissement tumoral suite à une surconsommation de glucose par les cellules cancéreuses mais il est également possible de détecter des diminutions d'accumulation du [^{18}F]FDG traduisant des troubles du métabolisme du glucose. Ceci est utilisé en clinique dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (71,73,74). La TEP FDG, peut également être proposée pour suivre un effet thérapeutique via la diminution de la consommation de glucose dans le cas de cancers ou l'augmentation suite à un rétablissement du fonctionnement neuronal.

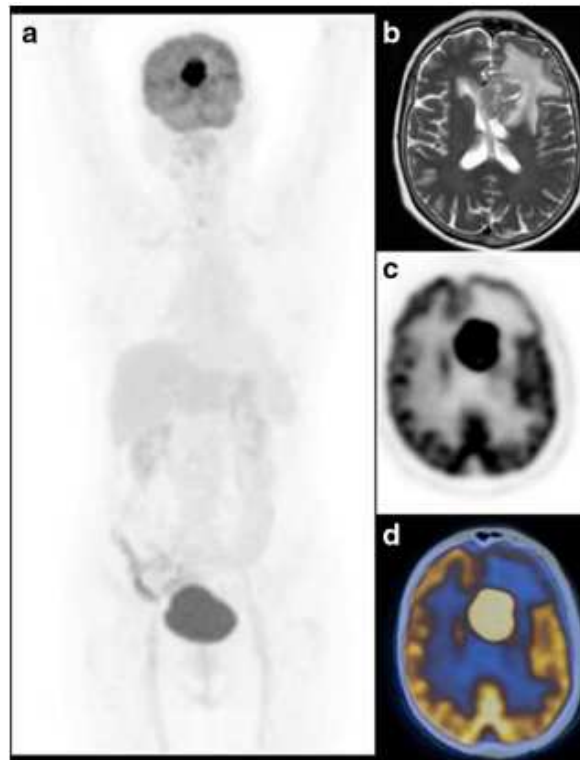


Figure 19: Cas clinique représentatif d'un lymphome à cellules B diffus. (D'après Albano et al, 2019). (71)

Cas représentatif d'un lymphome à cellules B cérébral avec des images TEP/CT positives au [^{18}F]FDG. Une femme de 67 ans présentant une lésion cérébrale focale unique de 3 cm, avec un aspect IRM typique montrant une augmentation de la captation du [^{18}F]FDG au niveau de la projection d'intensité maximale (PIM) correspondant à la lésion cérébrale (a). IRM pondérée en T2 avec contraste (b) détectant une lésion améliorée homogène entourée d'un œdème dans les ganglions de la base gauche, images TEP axiales (c) et TEP/TDM fusionnées (d) confirmant la présence la fixation focale du [^{18}F]FDG avec un SUVmax de 47, un rapport SUVmax de la lésion au foie de 11,8, un rapport SUVmax de la lésion au pool sanguin de 17 et un rapport Signal/Bruit de 6,7.

Ce radiotracer reflète le métabolisme du glucose au sein de diverses populations cellulaires, étant non spécifique d'un type cellulaire mais reflétant le métabolisme du glucose présent au sein de toutes les cellules. Pour améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques, il est nécessaire de développer des traceurs ciblant des processus spécifiques de types cellulaires. Dans le cas de la neuroinflammation, des traceurs ont été développés pour suivre l'activation de certaines populations cellulaires impliquées dans les processus neuroinflammatoires.

2. Pour suivre la neuroinflammation : marqueur glial, la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO)

a. Localisation et structure

Initialement, les études sur la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO) remontent aux années 1980 et fût nommée initialement récepteur périphérique aux benzodiazépines : PBR (peripheral benzodiazepine receptor). En effet, sa découverte a été permise dès 1977 via des études de localisation des sites de fixation des benzodiazépines (comme par exemple le Diazepam) (75). Les benzodiazépines sont des composés utilisés pour leurs propriétés anxiolytiques et sédatives. Ils présentent une affinité pour deux types de récepteurs: le récepteur aux benzodiazépines central (CBR) retrouvé au niveau des neurones exclusivement et le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR ou TSPO) (76). La découverte de PBR a été permise grâce à des études d'affinité sur des homogénats de tissus membranaires de rongeurs issus du cerveau et divers homogénats mitochondriaux provenant des reins, des foies et des poumons. L'utilisation du Diazepam marqué au tritium (^3H -Diazepam) et des étapes de déplacement utilisant le Diazepam froid ou d'autres benzodiazépines non radioactives a permis de mettre en évidence une fixation spécifique de ce dernier au niveau cérébral (75) mais aussi dans les tissus périphériques.

La protéine TSPO est très conservée au cours de l'évolution, sa présence est détectable dans les 3 règnes du vivant : eucaryotes, bactéries et archées (77). Le gène *Tspo* est retrouvé en un seul exemplaire dans le génome humain sur le chromosome 22. Il code pour la TSPO, une protéine hydrophobe composée de 169 acides aminés ayant une taille de 18 kDa. Cette protéine a cinq segments transmembranaires en hélice α qui se situent à l'interface de la membrane externe et interne des mitochondries. La TSPO peut agir seule ou avoir plusieurs partenaires comme l'Adenine Nucleotide Transporteur (ANT) et le Voltage Dependent Anion Channel (VDAC). Ce

complexe multiprotéique constitue le pore de transition de perméabilité mitochondriale, où le rôle de TSPO est de réguler la perméabilité mitochondriale (78). L'expression de TSPO varie selon l'organe et les tissus. En effet au niveau cérébral, TSPO est exprimée au niveau des cellules gliales et des cellules épendymaires en condition basale. Aucune expression n'a été trouvée dans les neurones (79).

b. Fonctions et rôles physiologiques

La TSPO est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. Cette protéine est un facteur clé dans le flux de transport du cholestérol vers les mitochondries pour permettre l'initiation de la synthèse des hormones stéroïdes. Elle présente également des rôles dans la protection contre le stress oxydatif, la respiration mitochondriale, le transport d'ions (80). C'est de par sa localisation et de ces fonctions qu'une nouvelle nomenclature a vu le jour nommant ainsi cette protéine TSPO (81).

c. Surexpression de TSPO et inflammation

La TSPO est également un marqueur de l'activation microgliale et astrocytaire soulignant une neuroinflammation. En conditions basales, une faible expression de TSPO est retrouvée au sein du cerveau, mais lors d'apparition de pathologies neurologiques ou de dommages cérébraux la surexpression de TSPO est colocalisée au niveau des microglies et des astrocytes ayant un phénotype activé (82) (**Figure 20**). Cette surexpression souligne la mise en place de processus inflammatoires suite à l'activation de ces populations gliales. Cependant, bien que le phénotype pro ou anti-inflammatoire soit difficilement relié à cette surexpression, une étude récente suggère que la surexpression de TSPO serait préférentiellement retrouvée dans les microglies et les astrocytes ayant un profil pro-inflammatoire (83).

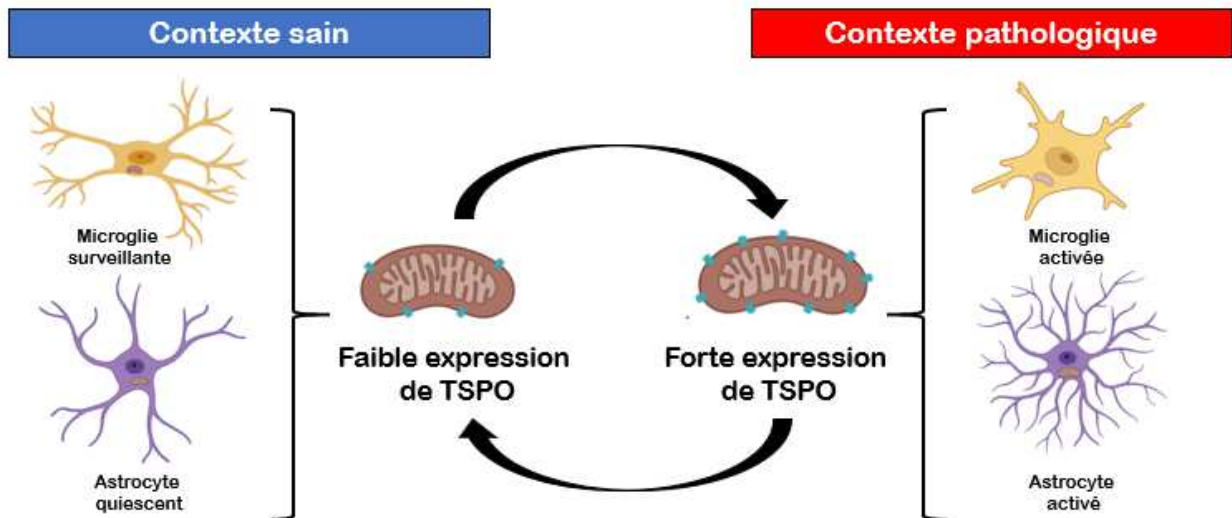


Figure 20: Modification de l'expression de la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO).

En contexte sain, TSPO sera exprimée à un niveau basal par certaines populations cellulaires notamment gliales (microglies/astrocytes). La surexpression de cette dernière au sein de ces populations cellulaires est retrouvée dans divers contextes pathologiques.

d. Radiotraceurs ciblant TSPO

La protéine TSPO peut donc être utilisée pour suivre l'évolution de la neuroinflammation. Comme vu précédemment, l'augmentation de l'expression de TSPO est un marqueur de la présence de processus neuroinflammatoires. La fluctuation de son niveau d'expression au sein des tissus dépend de la présence ou non de processus inflammatoires et fait de la TSPO une cible moléculaire en imagerie TEP (**Figure 21**). Le ciblage de cette protéine permet de suivre l'évolution de la neuroinflammation dans diverses conditions pathologiques suite à l'activation de microglies et/ou d'astrocytes. En effet, l'expression de TSPO a été suivie dans un panel de conditions pathologiques variant de l'étude de la neuroinflammation au sein de lésions cérébrales, de maladies neurodégénératives, de tumeurs cérébrales ainsi que dans des troubles psychiatriques, mais également dans des tumeurs périphériques.

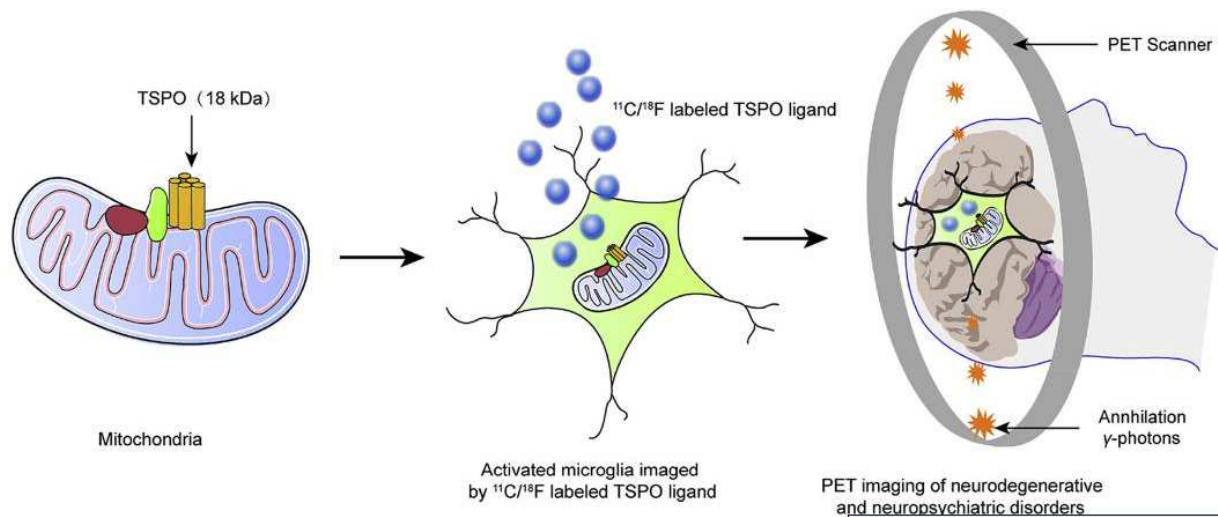


Figure 21: Principe de l'imagerie TEP TSPO. (D'après Werry et al, 2019).

Le premier traceur à avoir été développé pour cibler TSPO est le [¹¹C]PK11195 dès les années 1980 (84). C'est un antagoniste sélectif de TSPO n'appartenant pas à la classe des benzodiazépines. Puis des années plus tard, des études ont montré que son énantiomère le (R)-[¹¹C]PK11195 avait plus d'affinité envers la cible (85), faisant de celui-ci un meilleur candidat pour évaluer la neuroinflammation dans divers pathologies et modèles animaux. Cependant il présente plusieurs inconvénients. Une fixation non spécifique assez importante soulignant un ratio signal sur bruit faible, la demi-vie de l'isotope associé, le carbone 11, est très courte (20 min) ce qui complique son utilisation clinique sans site de production (cyclotron) à proximité. Ces observations ont démontré le besoin d'avoir des radiotraceurs avec des propriétés plus propices à une utilisation clinique pour cibler TSPO.

Depuis, des radiotraceurs de deuxième voire de troisième génération ont été développés et utilisés dès 2008 (86). Ces radiotraceurs présentent l'avantage d'avoir une meilleure fixation spécifique sur les TSPO, améliorant considérablement la sensibilité des images. Cependant, ces radiotraceurs ont révélé l'existence d'un polymorphisme génétique rs6971 du gène *tspo* chez l'Homme. Cela entraîne la substitution d'un seul acide aminé (Alanine en Thréonine) en position 147 de la protéine TSPO. En effet, ces radiotraceurs présentent une affinité différente selon l'acide aminé présent à cet endroit spécifique. Ils se fixent préférentiellement sur la forme protéique de TSPO possédant l'alanine (87).

Une synthèse sur les études cliniques ciblant TSPO dans diverses pathologies a montré que sur 3914 patients le (R)-[¹¹C]PK11195 a été utilisé dans 47% des cas et que ces dernières années de plus en plus d'études utilisaient d'autres radiotraceurs TSPO (88).

Un des traceurs de deuxième génération développé et utilisé depuis dans notre laboratoire est le [¹⁸F]DPA-714 (89). De multiples études de biodistribution ont été effectuées pour évaluer sa fixation et sa cinétique en conditions saines. Peyronneau et ses collaborateurs, ont mené une étude comparative inter-espèce (rat, babouin, Homme) sur la fixation du DPA-714. Ils ont mis en évidence des dérivés métabolites du [¹⁸F]DPA-714 tel que le [¹⁸F]dééthyle, le [¹⁸F]hydroxyle et le [¹⁸F]acide carboxylique (90). En 2015, Vicidomini et ses collaborateurs ont caractérisé la biodistribution *in vivo* de ce radiotracer cette fois-ci chez des souris Swiss saines. Le radiotracer a été localisé en forte concentration dans les tissus périphériques tels que les poumons, le cœur, les reins et la rate et une faible fixation a été observée au niveau cérébral. Cependant que ce soit au niveau des régions périphériques ou du cerveau sain, aucun radiométabolite n'a été observé 60 min post injection (91). Une étude a évalué la performance du radioligand dans divers modèles rongeurs (rats, souris) de cancers et d'inflammation. Ils ont montré que malgré la conservation inter espèce de la TSPO, des différences de fixation était visibles entre les rats et les souris que ce soit au niveau des organes sains ou des tissus cancéreux. La quantité intacte de [¹⁸F]DPA-714 présente dans le plasma était supérieure chez les souris (52,3%) comparée aux rats (16%) 60 minutes post-injection. Le métabolisme retardé de ce radiotracer chez les souris engendrerait un ratio signal/bruit plus faible au sein des modèles testés (92).

Les études *in vivo* et *ex vivo* sur diverses espèces montrent une divergence des propriétés pharmacocinétiques et des caractéristiques du métabolisme du [¹⁸F]DPA-714 selon le modèle étudié. Ces aspects démontrent l'importance de prendre en compte et de caractériser la fixation du DPA-714 dans le modèle étudié.

Dans une étude clinique, Arlicot et ses collaborateurs ont évalué la fixation du [¹⁸F]DPA-714 chez des humains sains pour déterminer les propriétés cinétiques cérébrales. Ils ont mis en évidence une bonne stabilité du radiotracer dans l'organisme avec seulement 20% de métabolites retrouvés dans le sang 20 min post-injection. La fixation cérébrale maximale est retrouvée à 5 min post injection suivie par une élimination rapide d'environ 25 min et une phase plus lente d'élimination jusqu'à 90 min post-injection (93). En 2015, Lavisse et ses collaborateurs ont montré que chez l'homme la fixation du radiotracer [¹⁸F]DPA-714 était influencée par le polymorphisme génétique de TSPO retrouvé chez les volontaires sains classifiant ainsi les sujets en 3 catégories (fixateurs de faible, forte ou d'affinité mixte) (94).

Les études précliniques et cliniques sur la biodistribution du [¹⁸F]DPA-714 dans des conditions saines ont permis de positionner ce dernier comme étant un radiotracer présentant

toutes les caractéristiques nécessaires à son utilisation pour assurer une mesure sensible et précise des changements dans les processus neuroinflammatoires en conditions pathologiques.

En préclinique, le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ a été testé sur différents modèles pathologiques. Sur des modèles d'inflammation soit chronique (épilepsie) ou aiguë (AVC) la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ *in vivo* correspond bien aux zones surexprimant des marqueurs microgliaux. Le DPA-714 est par conséquent un bon marqueur de la neuroinflammation à la fois aiguë et chronique (95). Des études comparatives entre les différentes générations de radiotracer permet de mieux comprendre leur comportement envers la cible et de déterminer leur affinité. En 2017, Sridharan et ses collaborateurs ont comparé des radiotraceurs TSPO dans un modèle rat induisant une neuroinflammation focale faible à modérée en intracérébral. Le $[^{18}\text{F}]\text{-GE-180}$ présente un ratio lésion/contralatéral plus élevé comparé au (R)- $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$. Ce qui suggère qu'un niveau d'inflammation faible à modéré est alors détectable par la seconde génération de traceurs TSPO (96). Les radiotraceurs de deuxième génération présentent quand même un inconvénient pour les études cliniques, ils sont sensibles au polymorphisme de la protéine TSPO humaine. Cela nécessite la catégorisation des patients suivant leur profil d'affinité et exclu les sujets avec une faible affinité dans les études cliniques. Depuis le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ a été utilisé dans plusieurs études cliniques dans les maladies neurodégénératives et psychiatriques (97–100).

Depuis des radiotraceurs TSPO de 3^{-ème} génération sont en cours de développement et testés en préclinique et leur biodistribution est évaluée chez des sujets sains. L'étude de leurs caractéristiques permettra leur utilisation potentielle en clinique (101). En effet, selon une étude récente ils seraient moins sensibles au polymorphisme TSPO (102).

En résumé, les nouvelles générations de radiotraceurs TSPO confirment les résultats trouvés avec leur ancêtre le (R)- $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ mais présentent plusieurs avantages :

- Meilleur rapport signal/bruit
- Capables de détecter une inflammation faible à modérée

Avec ces caractéristiques ces radiotraceurs ont un fort potentiel d'utilisation pour monitorer l'inflammation diffuse souvent retrouvée dans les maladies neurodégénératives que ce soit en préclinique ou clinique.

La TSPO a souvent été associée aux microglies, cependant des études ont montrées que les astrocytes étaient également capables de la surexprimer en cas d'inflammation. Dans une étude en imagerie TEP *in vivo*, utilisant un modèle rongeur d'activation astrocytaire sans l'engendrement d'activation microgliale, deux radiotraceurs ciblant TSPO ($[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ et $[^{11}\text{C}]\text{-SSR180515}$) ont été

utilisé et une correspondance entre le volume de fixation du radiotracer et le volume occupé par les cellules astrocytaires a été montrée (103). Dès lors le signal TEP TSPO détectable dans les études peut être à la fois dû à l'activation des microglies et des astrocytes. En combinant par conséquent des études *ex vivo* en préclinique, il est possible de déterminer la dynamique d'expression de TSPO et de l'associer à divers types cellulaires.

Le suivi de la neuroinflammation utilisant des radiotraceurs TSPO pose cependant diverses problématiques. En effet, les récentes évidences montrant que le signal TSPO *in vivo* peut provenir de différentes populations cellulaires souligne que l'imagerie TSPO ne permet pas de distinguer l'activation des astrocytes et des microglies lors de phases inflammatoires. De plus, les différents phénotypes (pro/anti inflammatoires) que peuvent arborer les microglies ou les astrocytes sont alors indifférentiables *in vivo*. Ces problématiques stimulent la voie vers un développement de traceurs étant plus spécifique (104).

OBJECTIFS DES ÉTUDES

Cette thèse va se décliner en 3 grandes parties regroupant les projets effectués en imagerie TEP *in vivo*. Ce manuscrit repose sur l'influence que peuvent avoir les inhibiteurs des acétylcholinestérases sur divers mécanismes cérébraux.

Étude 1 :

Une intoxication avec un inhibiteur « irréversible » des acétylcholinestérases (NIMP, analogue du sarin) a été effectuée dans un modèle murin. L'imagerie TEP longitudinale au [¹⁸F]DPA-714 est étudiée afin de :

- i. Déterminer le profil d'évolution de la neuroinflammation suite à l'intoxication et de proposer une fenêtre thérapeutique.
- ii. Suivre l'impact d'un traitement neuroprotecteur.

Étude 2 :

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (MA), l'objectif de cette étude est de suivre *in vivo* des effets d'un traitement avec un inhibiteur réversible des AChE (le Donépézil) sur le métabolisme cérébral du glucose en utilisant le [¹⁸F]FDG dans un modèle murin.

Étude 3 :

Divers mécanismes pathophysiologiques présents dans les précédentes études peuvent impacter l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE). Il est donc primordial d'avoir des outils permettant la quantification de la perméabilité de la BHE *in vivo*. Dans ce cadre un projet utilisant la technique des ultrasons focalisés a été mis en place afin d'investiguer de repositionner l'imagerie TEP au [¹⁸F]FDS comme biomarqueur quantitatif de l'intégrité de la BHE *in vivo*

La **Figure 22** représente l'ensemble des objectifs de travail regroupant les 3 projets effectués au cours de ma thèse.

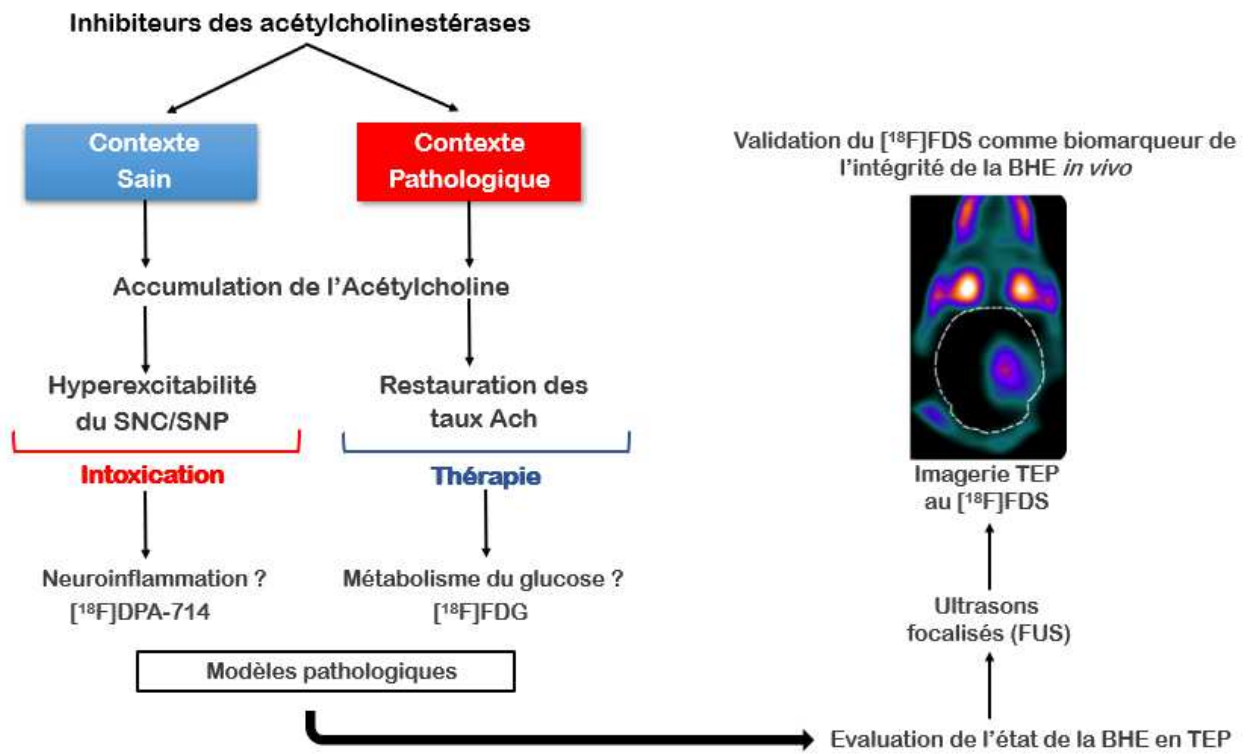


Figure 22: Objectifs des études

RÉFÉRENCES

1. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol.* 2016;133:39-59.
2. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* déc 2013;19(12):1584-96.
3. Worzfeld T, Schwaninger M. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* févr 2016;36(2):340-62.
4. Bednarczyk J, Lukasiuk K. Tight junctions in neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 2011;71(4):393-408.
5. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* janv 2007;12(1-2):54-61.
6. Pardridge WM, Eisenberg J, Yang J. Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem.* juin 1985;44(6):1771-8.
7. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol.* 25 mai 2015;209(4):493-506.
8. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: Key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci.* 26 mai 2016;19(6):771-83.
9. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 3 avr 2014;508(7494):55-60.
10. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222(5):2017-29.
11. Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Waagepetersen HS. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J Biol Chem.* 11 mai 2018;293(19):7108-16.
12. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science.* 23 déc 2011;334(6063):1727-31.
13. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* oct 2000;25(9-10):1439-51.
14. Pekny M, Pekna M. Astrocyte Reactivity and Reactive Astroglia: Costs and Benefits. *Physiol Rev.* oct 2014;94(4):1077-98.
15. Ferrer I. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol.* 13 août 2017;27(5):645-74.
16. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* nov 2007;10(11):1387-94.
17. Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* févr 2013;39(1):3-18.
18. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* août 2016;19(8):987-91.

19. Barakat R, Redzic Z. The Role of Activated Microglia and Resident Macrophages in the Neurovascular Unit during Cerebral Ischemia: Is the Jury Still Out? *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2016;25 Suppl 1:3-14.
20. Jiang C-T, Wu W-F, Deng Y-H, Ge J-W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Mol Med Rep.* mai 2020;21(5):2006-18.
21. Liu L, Liu J, Bao J, Bai Q, Wang G. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Front Immunol.* 8 juill 2020;11:1024.
22. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* mars 2009;32(3):160-9.
23. Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron.* 27 sept 2017;96(1):17-42.
24. Borges R, García AG. One hundred years from Otto Loewi experiment, a dream that revolutionized our view of neurotransmission. *Pflugers Arch.* juin 2021;473(6):977-81.
25. Newman E, Gupta K, Climer J, Monaghan C, Hasselmo M. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci.* 2012;6:24.
26. Mesulam MM. The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 1996;109:285-97.
27. Iyer SR, Shah SB, Lovering RM. The Neuromuscular Junction: Roles in Aging and Neuromuscular Disease. *Int J Mol Sci.* 28 juill 2021;22(15):8058.
28. Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, Role LW. Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron.* 21 sept 2016;91(6):1199-218.
29. Croxson PL, Kyriazis DA, Baxter MG. Cholinergic modulation of a specific memory function of prefrontal cortex. *Nat Neurosci.* 6 nov 2011;14(12):1510-2.
30. Koller G, Satzger W, Adam M, Wagner M, Kathmann N, Soyka M, et al. Effects of scopolamine on matching to sample paradigm and related tests in human subjects. *Neuropsychobiology.* 2003;48(2):87-94.
31. Fon EA, Edwards RH. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve.* mai 2001;24(5):581-601.
32. Amenta F, Tayebati SK. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr Med Chem.* 2008;15(5):488-98.
33. Zhang Q, Lu Y, Bian H, Guo L, Zhu H. Activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):971-85.
34. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther.* janv 2013;137(1):22-54.
35. Gharpure A, Noviello CM, Hibbs RE. Progress in nicotinic receptor structural biology. *Neuropharmacology.* juill 2020;171:108086.
36. Scarr E. Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets. *CNS Neurosci Ther.* 26 févr 2011;18(5):369-79.

37. Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, et al. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry*. juill 2003;8(7):673-9.
38. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. mai 2013;11(3):315-35.
39. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 6 sept 2010;187(1-3):10-22.
40. Thapa S, Lv M, Xu H. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(17):1665-76.
41. Taylor P, Brown JH. Acetylcholinesterase and the Termination of Acetylcholine Action. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp 6th Ed* [Internet]. 1999 [cité 16 sept 2021]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28076/>
42. Kawakami Y, Inoue A, Kawai T, Wakita M, Sugimoto H, Hopfinger AJ. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorg Med Chem*. sept 1996;4(9):1429-46.
43. Ismail MM, Kamel MM, Mohamed LW, Faggal SI. Synthesis of New Indole Derivatives Structurally Related to Donepezil and Their Biological Evaluation as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Molecules*. 25 avr 2012;17(5):4811-23.
44. Ali SK, Hamed AR, Soltan MM, El-Halawany AM, Hegazy UM, Hussein AA. Kinetics and molecular docking of vasicine from *Adhatoda vasica*: An acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *South Afr J Bot*. 1 mai 2016;104:118-24.
45. Moss DE. Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? *Int J Mol Sci*. 13 mai 2020;21(10):3438.
46. Rathnayake LK, Northrup SH. Structure and mode of action of organophosphate pesticides: A computational study. *Comput Theor Chem*. 15 juill 2016;1088:9-23.
47. Upholt WM, Kearney PC. Pesticides. *N Engl J Med*. 22 déc 1966;275(25):1419-26.
48. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet Lond Engl*. 16 févr 2008;371(9612):597-607.
49. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons [Internet]. OPCW. [cité 4 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.opcw.org/node/2632>
50. Vale JA, Marrs TC, Maynard RL. Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. *Clin Toxicol Phila Pa*. nov 2018;56(11):1093-7.
51. Minshall D. Gulf War Syndrome: a review of current knowledge and understanding. *J R Nav Med Serv*. 2014;100(3):252-8.
52. Suzuki T, Morita H, Ono K, Maekawa K, Nagai R, Yazaki Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet Lond Engl*. 15 avr 1995;345(8955):980.
53. Dolgin E. Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs. *Nat Med*. oct 2013;19(10):1194-5.
54. Imposition of Chemical and Biological Weapons Control and Warfare Elimination Act Sanctions on North Korea [Internet]. United States Department of State. [cité 4 oct 2021]. Disponible sur: <https://2017-2021.state.gov/imposition-of-chemical-and-biological-weapons-control-and-warfare-elimination-act-sanctions-on-north-korea/>

55. Steindl D, Boehmerle W, Körner R, Praeger D, Haug M, Nee J, et al. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet Lond Engl.* 16 janv 2021;397(10270):249-52.
56. Greathouse B, Zahra F, Brady MF. Acetylcholinesterase Inhibitors Toxicity. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535428/>
57. Misik J, Pavlikova R, Cabal J, Kuca K. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem Toxicol.* janv 2015;38(1):32-6.
58. King AM, Aaron CK. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg Med Clin North Am.* févr 2015;33(1):133-51.
59. Hampel H, Mesulam M-M, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain J Neurol.* 1 juill 2018;141(7):1917-33.
60. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA.* 6 avr 1994;271(13):992-8.
61. Andersen JB, Engeland A, Owe JF, Gilhus NE. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *Eur J Neurol.* déc 2010;17(12):1445-50.
62. Quilliam JP. Di-iso propylfluorophosphonate (DFP) its pharmacology and its therapeutic uses in glaucoma and myasthenia gravis. *Postgrad Med J.* juin 1947;23(260):280-2.
63. Annavarapu RN, Kathi S, Vadla VK. Non-invasive imaging modalities to study neurodegenerative diseases of aging brain. *J Chem Neuroanat.* janv 2019;95:54-69.
64. What is an MRI scan and what can it do? *Drug Ther Bull.* déc 2011;49(12):141-4.
65. Zimmer L. [PET imaging for better understanding of normal and pathological neurotransmission]. *Biol Aujourd'hui.* 2019;213(3-4):109-20.
66. Gosseries O, Demertzi A, Noirhomme Q, Tshibanda J, Boly M, Op de Beeck M, et al. [Functional neuroimaging (fMRI, PET and MEG): what do we measure?]. *Rev Med Liege.* juin 2008;63(5-6):231-7.
67. Laruelle M, Slifstein M, Huang Y. Relationships between radiotracer properties and image quality in molecular imaging of the brain with positron emission tomography. *Mol Imaging Biol.* déc 2003;5(6):363-75.
68. Pike VW. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* août 2009;30(8):431-40.
69. de Beco V, Le Bars D, Scherrmann J-M. [Fluorine-18 in radiopharmacy]. *Ann Pharm Fr.* janv 2008;66(1):60-5.
70. Stöcklin GL. Is there a future for clinical fluorine-18 radiopharmaceuticals (excluding FDG)? *Eur J Nucl Med.* déc 1998;25(12):1612-6.
71. Albano D, Bosio G, Bertoli M, Giubbini R, Bertagna F. 18F-FDG PET/CT in primary brain lymphoma. *J Neurooncol.* févr 2018;136(3):577-83.
72. Pauwels EK, Ribeiro MJ, Stoot JH, McCready VR, Bourguignon M, Mazière B. FDG accumulation and tumor biology. *Nucl Med Biol.* mai 1998;25(4):317-22.
73. Singh TD, Josephs KA, Machulda MM, Drubach DA, Apostolova LG, Lowe VJ, et al. Clinical, FDG and amyloid PET imaging in posterior cortical atrophy. *J Neurol.* juin 2015;262(6):1483-92.

74. Bralet M-C, Buchsbaum MS, DeCastro A, Shihabuddin L, Mitelman SA. FDG-PET scans in patients with Kraepelinian and non-Kraepelinian schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* sept 2016;266(6):481-94.
75. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1977;74(9):3805-9.
76. Richards JG, Möhler H. Benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology.* févr 1984;23(2B):233-42.
77. Hiser C, Montgomery BL, Ferguson-Miller S. TSPO protein binding partners in bacteria, animals, and plants. *J Bioenerg Biomembr.* 2021;53(4):463-87.
78. Chelli B, Falleni A, Salvetti F, Gremigni V, Lucacchini A, Martini C. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue. *Biochem Pharmacol.* 15 mars 2001;61(6):695-705.
79. Gui Y, Marks JD, Das S, Hyman BT, Serrano-Pozo A. Characterization of the 18 kDa translocator protein (TSPO) expression in post-mortem normal and Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol.* 25 juill 2019;30(1):151-64.
80. Bonsack F, Sukumari-Ramesh S. TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions. *Int J Mol Sci.* 7 juin 2018;19(6):1694.
81. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère J-J, Lindemann P, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* août 2006;27(8):402-9.
82. Betlazar C, Harrison-Brown M, Middleton RJ, Banati R, Liu G-J. Cellular Sources and Regional Variations in the Expression of the Neuroinflammatory Marker Translocator Protein (TSPO) in the Normal Brain. *Int J Mol Sci.* 11 sept 2018;19(9):E2707.
83. Pannell M, Economopoulos V, Wilson TC, Kersemans V, Isenegger PG, Larkin JR, et al. Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. *Glia.* févr 2020;68(2):280-97.
84. Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, et al. Labelling of « peripheral-type » benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem.* déc 1983;41(6):1744-50.
85. Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. Synthesis of the enantiomers of [N-methyl-11C]PK 11195 and comparison of their behaviours as radioligands for PK binding sites in rats. *Nucl Med Biol.* 1 mai 1994;21(4):573-81.
86. Dollé F, Luus C, Reynolds A, Kassiou M. Radiolabelled molecules for imaging the translocator protein (18 kDa) using positron emission tomography. *Curr Med Chem.* 2009;16(22):2899-923.
87. Owen DR, Yeo AJ, Gunn RN, Song K, Wadsworth G, Lewis A, et al. An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* janv 2012;32(1):1-5.
88. Chauveau F, Becker G, Boutin H. Have (R)-[11C]PK11195 challengers fulfilled the promise? A scoping review of clinical TSPO PET studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 13 août 2021;
89. James ML, Fulton RR, Vercoullie J, Henderson DJ, Garreau L, Chalon S, et al. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* mai 2008;49(5):814-22.

90. Peyronneau M-A, Saba W, Goutal S, Damont A, Dollé F, Kassiou M, et al. Metabolism and Quantification of [18F]DPA-714, a New TSPO Positron Emission Tomography Radioligand. *Drug Metab Dispos.* 1 janv 2013;41(1):122-31.
91. Vicidomini C, Panico M, Greco A, Gargiulo S, Coda ARD, Zannetti A, et al. In vivo imaging and characterization of [(18)F]DPA-714, a potential new TSPO ligand, in mouse brain and peripheral tissues using small-animal PET. *Nucl Med Biol.* mars 2015;42(3):309-16.
92. Zheng J, Winkeler A, Peyronneau M-A, Dollé F, Boisgard R. Evaluation of PET Imaging Performance of the TSPO Radioligand [18F]DPA-714 in Mouse and Rat Models of Cancer and Inflammation. *Mol Imaging Biol.* févr 2016;18(1):127-34.
93. Arlicot N, Vercouillie J, Ribeiro M-J, Tauber C, Venel Y, Baulieu J-L, et al. Initial evaluation in healthy humans of [18F]DPA-714, a potential PET biomarker for neuroinflammation. *Nucl Med Biol.* mai 2012;39(4):570-8.
94. Lavisse S, García-Lorenzo D, Peyronneau M-A, Bodini B, Thiriez C, Kuhnast B, et al. Optimized Quantification of Translocator Protein Radioligand ¹⁸F-DPA-714 Uptake in the Brain of Genotyped Healthy Volunteers. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* juill 2015;56(7):1048-54.
95. Harhausen D, Sudmann V, Khojasteh U, Müller J, Zille M, Graham K, et al. Specific Imaging of Inflammation with the 18kDa Translocator Protein Ligand DPA-714 in Animal Models of Epilepsy and Stroke. *PLoS ONE.* 2 août 2013;8(8):e69529.
96. Sridharan S, Lepelletier F-X, Trigg W, Banister S, Reekie T, Kassiou M, et al. Comparative Evaluation of Three TSPO PET Radiotracers in a LPS-Induced Model of Mild Neuroinflammation in Rats. *Mol Imaging Biol.* 2017;19(1):77-89.
97. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA, et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain J Neurol.* avr 2016;139(Pt 4):1252-64.
98. Bodini B, Poirion E, Tonietto M, Benoit C, Palladino R, Maillart E, et al. Individual Mapping of Innate Immune Cell Activation Is a Candidate Marker of Patient-Specific Trajectories of Worsening Disability in Multiple Sclerosis. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* juill 2020;61(7):1043-9.
99. Golla SSV, Boellaard R, Oikonen V, Hoffmann A, van Berckel BNM, Windhorst AD, et al. Parametric Binding Images of the TSPO Ligand 18F-DPA-714. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* oct 2016;57(10):1543-7.
100. Lavisse S, Goutal S, Wimberley C, Tonietto M, Bottlaender M, Gervais P, et al. Increased microglial activation in patients with Parkinson disease using [18F]-DPA714 TSPO PET imaging. *Parkinsonism Relat Disord.* janv 2021;82:29-36.
101. Werry EL, Bright FM, Pigué O, Ittner LM, Halliday GM, Hodges JR, et al. Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 28 juin 2019;20(13):3161.
102. Fujita M, Kobayashi M, Ikawa M, Gunn RN, Rabiner EA, Owen DR, et al. Comparison of four 11C-labeled PET ligands to quantify translocator protein 18 kDa (TSPO) in human brain: (R)-PK11195, PBR28, DPA-713, and ER176-based on recent publications that measured specific-to-non-displaceable ratios. *EJNMMI Res.* 16 oct 2017;7(1):84.
103. Lavisse S, Guillermier M, Hérard A-S, Petit F, Delahaye M, Van Camp N, et al. Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 8 août 2012;32(32):10809-18.

104. Narayanaswami V, Dahl K, Bernard-Gauthier V, Josephson L, Cumming P, Vasdev N. Emerging PET Radiotracers and Targets for Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: Outlook Beyond TSPO. *Mol Imaging*. déc 2018;17:1536012118792317.

ÉTUDE 1

Intoxication avec un inhibiteur irréversible des acétylcholinestérases, l'organophosphoré NIMP (analogue du sarin) dans un modèle murin

INTRODUCTION

I. Les organophosphorés (OPs)

1. Voies de pénétration dans l'organisme

Retrouvés dans de nombreux produits phytosanitaires, les OPs peuvent entrer dans l'organisme par diverses voies notamment digestive, respiratoire et/ou transcutanée (**Figure 23**). Ces composés sont aussi retrouvés dans les agents neurotoxiques, dérivés d'insecticides et utilisés comme arme de guerre chimique (ex : sarin, VX, Novitchok). Ce sont des agents très lipophiles qui traversent rapidement la peau, le tissu conjonctif oculaire, et les muqueuses. Des études épidémiologiques effectuées dans divers pays (asiatiques, Etats-Unis) ont montré une augmentation des cas d'intoxication depuis les années 70 (1). Ces intoxications peuvent survenir lors de contacts volontaires ou involontaires avec ces composés. En effet, les tentatives de suicide par l'ingestion de certains pesticides/insecticides contenant des OPs sont fréquentes dans les pays en voies de développement (2). Les états dépressifs mal connus et mal diagnostiqués dans ces pays mènent dans certains cas au suicide avec une prévalence plus importante chez les femmes et dans les zones rurales. Les intoxications aux OPs de façon accidentelle quant à elles sont retrouvées en grande majorité dans les pays développés (3). Dans un contexte professionnel (ex : agriculture), le risque d'exposition aux OPs par voie transcutanée est fortement augmenté. Une température élevée provoque une augmentation de la perméabilité des gants de protection ainsi qu'une dilatation des pores de la peau responsables d'un risque plus élevé de contamination par les OPs (4). De plus, la présence de lésions cutanées va également favoriser le passage des OPs (5). Ce mode d'exposition étant le plus répandu dans les pays développés plusieurs recherches ont permis d'étudier la perméabilité de la peau à divers composés OPs. Pour cela, des modèles cutanés *in vitro* et *in vivo* ont été développés pour prédire l'absorption des OPs suivant la dose utilisée et la durée d'exposition (6,7). Contrairement à une inhalation ou à une absorption digestive, la distribution systémique en est alors ralentie avec ce mode d'exposition, et la diffusion lente des OPs au sein de l'organisme provoque un allongement du délai d'apparition des symptômes. Les symptômes peuvent en effet apparaître jusqu'à 48h post-intoxication. Ce type d'études permet également de déterminer des fenêtres temporelles d'action pour effectuer une décontamination précoce suivant le type d'OP utilisé afin de limiter l'absorption systémique du composé (8).

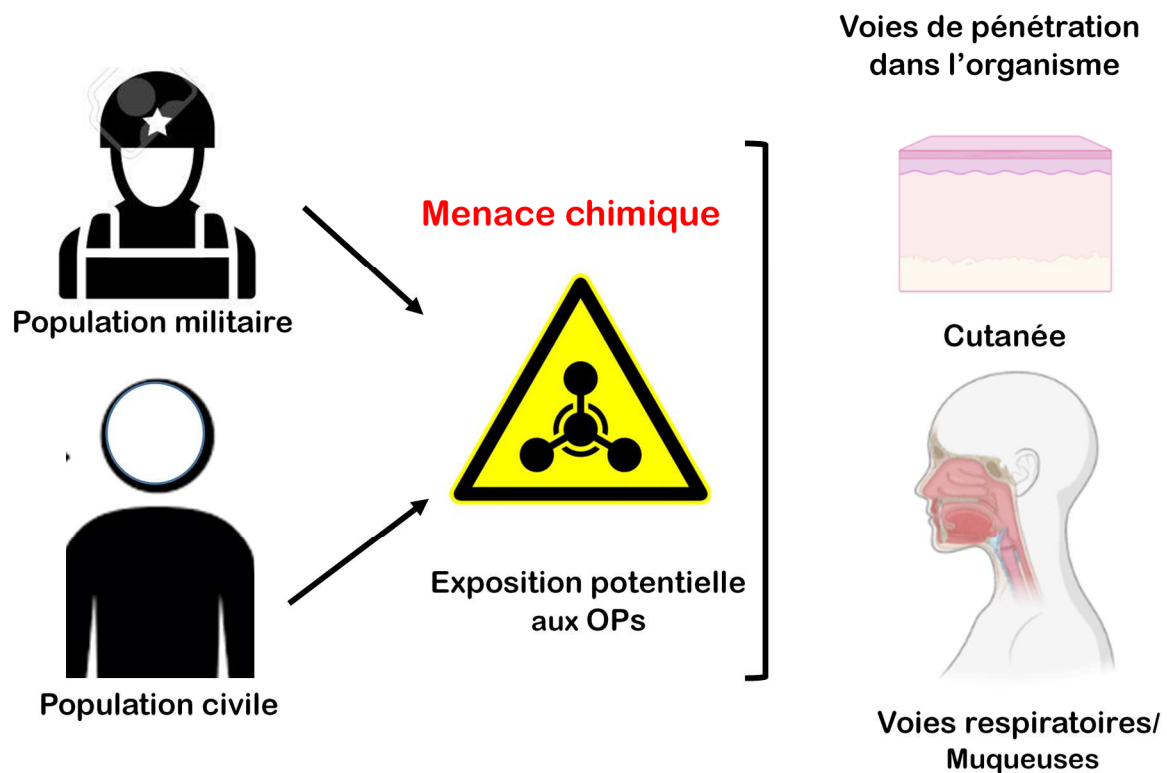


Figure 23: Voies de pénétration des OPs et du risque potentiel.

2. Voie d'élimination

Pour la grande majorité, les OPs ont une demi-vie biologique courte et vont rapidement être métabolisés dans l'organisme. L'excrétion de ces composés va s'effectuer par voie urinaire, la majorité des métabolites sont éliminés dans les 24h suivant l'exposition (9). Des prélèvements urinaires permettent de diagnostiquer et d'évaluer le degré d'intoxication suite au dosage de certains métabolites (9). Cela donne également une idée de la vitesse d'élimination de ces derniers. Ces biomarqueurs détectables dans les urines présentent alors un atout majeur pour étudier l'exposition des populations civiles aux OPs (10).

II. Intoxication aigüe vs chronique

1. Intoxication aigüe

L'intoxication aigüe est caractérisée par la pénétration d'une dose importante du neurotoxique au sein de l'organisme (dose symptomatique). Le neurotoxique provoque alors des effets immédiats induisant des symptômes systémiques rapidement observables. Lors d'une intoxication aigüe par des OPs, l'inhibition rapide et quasi-irréversible des AchE entraîne une hyperactivité du système cholinergique au niveau du SNC et SNP. La symptomatologie de l'exposition à des OPs a été fortement étudiée lors d'intoxications aigües (11,12). Au niveau du système parasympathique et sympathique les récepteurs muscariniques sont exprimés en grand nombre sur divers organes et tissus tel que les yeux, les glandes lacrymales, les bronches, le tube digestif, l'anus, la vessie et le cœur. Vu la multitude de cibles, l'action de l'Ach sera différente et les effets cliniques associés également. Si les récepteurs muscariniques du système sympathique sont suractivés par l'Ach (comme lors de l'inhibition des AChE après intoxication avec un OP), il y aura l'apparition dans un premier temps de symptômes digestifs tels que nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Puis la fixation de l'Ach au niveau des récepteurs muscariniques l'anus, de la vessie et du cœur va engendrer respectivement des incontinences fécales et urinaires ainsi qu'une diminution du rythme cardiaque (bradycardie). L'activation à outrance des récepteurs muscariniques du système parasympathique vont provoquer une intense activité sécrétoire au niveau des glandes lacrymales salivaires et sudoripares entraînant ainsi une vision troublée, des larmoiements, salivation, et rhinite. Ces manifestations cliniques se regroupent sous le terme du syndrome muscarinique (13).

Parallèlement, l'hyperactivation des récepteurs nicotiniques au niveau des jonctions neuromusculaires va entraîner des fasciculations, des crampes ainsi que la paralysie du diaphragme et des muscles respiratoires. L'activation excessive des récepteurs nicotiniques présents quant à eux au niveau du SNC provoque des céphalées, une confusion mentale, des tremblements, des convulsions et des crises épileptiques. Une dépression des centres respiratoires peut également survenir. Le couplage de la paralysie des muscles respiratoires et de la dépression des centres respiratoires cérébraux est souvent annonciateur d'une mort imminente s'il n'y a pas d'interventions pour contrecarrer ces effets (14).

L'ensemble de ses manifestations symptomatiques se regroupe sous le nom de syndrome cholinergique aiguë (**Figure 24**). Suite à une intoxication aiguë il faut agir rapidement afin d'assurer les fonctions vitales.

Effets de l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE).

Système	Récepteurs	Organe ou tissu	Action	Effet clinique
Parasympathique	Muscariniques	Œil	Contraction de l'iris et du muscle ciliaire	Vision trouble, myosis
		Glandes lacrymales, salivaires et sudoripares Cellules à mucus des voies respiratoires et du tube digestif	Sécrétion Sécrétion	Larmolement, salivation, hypersudation Rhinite, bronchorrhée, œdème pulmonaire, vomissements, diarrhée
Sympathique	Muscariniques	Bronches et tube digestif	Contraction du muscle lisse	Bronchospasme, nausées, crampes et douleurs abdominales
		Anus et vessie	Relaxation du muscle lisse sphinctérien	Incontinence fécale et urinaire
		Cœur	Dépression du nœud sinusal et augmentation de la période réfractaire au niveau du nœud auriculoventriculaire	Bradycardie, arythmies, bloc auriculoventriculaire
Jonction neuromusculaire	Nicotiniques	Muscles squelettiques	Contraction	Fasciculations, crampes, paralysies du diaphragme et des muscles respiratoires
		Cœur	Excitation	Tachycardie, hypertension
		Œil	Relaxation de l'iris	Mydriase
Système nerveux central	Nicotiniques	Cerveau	Excitation initialement, puis dépression.	Céphalées, malaise, confusion mentale, ataxie, tremblements, coma, convulsions, dépression des centres respiratoires, hypotension

Figure 24: Effets de l'inhibition de l'acétylcholinestérase. (D'après Testud et al, 2007)

Les effets d'une intoxication aiguë à des doses létales ont largement été étudiés (15,16). Cependant, l'impact d'une exposition unique à des doses sous létales pour explorer les effets physiopathologiques sur le cerveau est très peu investigué.

2. Intoxication chronique

Une intoxication chronique quant à elle se produit suite à des expositions répétées à de faibles doses de composés OPs, le plus souvent dans un contexte professionnel comme dans l'agriculture lors d'utilisations répétées de pesticides. Dans cette configuration, les symptômes sont moins visibles que lors d'une intoxication aiguë. Cependant, même si de faibles doses d'OPs ne sont pas considérées comme toxiques selon la réglementation, de plus en plus d'études ont montré qu'une exposition répétée à de faibles doses étaient néfastes pour la santé. L'utilisation répétée d'antiparasitaires OPs à faible dose chez les moutons sont responsables de la genèse de troubles cognitifs observables chez les fermiers éleveurs de moutons (17). Des expositions involontaires aux OPs lors de grossesses (nourriture, environnement) ont été détectées par voie urinaire dans des familles latino-américaines. Même si les taux urinaires d'OPs étaient plus élevés

chez ces femmes enceintes, les taux étaient dans les normes de mesure de la population américaine. Cependant, les taux urinaires d'OPs ont été associés à une performance intellectuelle plus faible chez les enfants sept ans après l'accouchement (18). Yolton et ses collaborateurs, ont étudié l'impact de l'exposition à des OPs lors de la gestation sur les performances à des tests neurocomportementaux chez des nouveau-nés âgés de cinq semaines. Ils n'ont pas mis en évidence de déficits comportementaux (19). Ces observations démontrent que suite à une intoxication chronique à de faibles doses d'OPs, le développement de divers troubles peut avoir lieu des années post-exposition.

III. Lien entre l'exposition aux OPs et le développement de maladies

1. Syndrome de la guerre du Golfe

Depuis les années 1990, de nombreuses recherches se sont intéressées à l'apparition d'une multitude de symptômes retrouvés chez des vétérans américains ayant été déployés lors de certains conflits militaires comme l'opération Tempête du désert. Environ 25 à 32% des vétérans américains déployés dans le golfe Persique ont développé des manifestations cliniques comme des maux de têtes, de la fatigue, des douleurs musculaires ainsi que des troubles cognitifs (20). Ce qui est intéressant de souligner, c'est que certains membres des troupes alliées (France, Canada, Royaume-Uni...) présents lors de cette opération ont également développés ces symptômes (21), alors que chez des militaires déployés dans d'autres zones géographiques ce type de syndrome n'a pas été observé. Une des hypothèses serait la mise en cause de l'exposition de ces vétérans à des OPs (insecticides, neurotoxiques de guerre). Cependant, divers événements environnementaux (stress, feux puits de pétrole...) ont également pu participer via une action synergique à la genèse de cette pathologie à multi-symptômes. Même si un lien direct est difficile à établir entre une exposition directe aux OPs durant la guerre du Golfe et les manifestations cliniques, il est dorénavant évident que ces expositions ont joué un rôle clé dans le développement des troubles comportementaux et neurologiques retrouvés chez les vétérans (22).

2. Pathologies neurologiques

a. Maladies neurodégénératives

L'augmentation des maladies neurodégénératives dans nos populations contemporaines pousse certains axes de recherche à comprendre l'origine de l'apparition de ces pathologies. Ces maladies deviennent handicapantes dans la vie de tous les jours car les patients perdent peu à peu leur autonomie. Des études épidémiologiques s'intéressent au lien entre l'effet de notre environnement sur l'incidence de ces maladies neurologiques (23). Une étude a montré qu'il existe un lien entre l'exposition aux OPs notamment les insecticides et le risque de développer la maladie d'Alzheimer (MA). Des questionnaires permettant de connaître l'historique d'exposition à divers pesticides couplés à des tests cognitifs ont été menés sur 10 ans. Sur les participants de cette étude il a été possible de démontrer qu'une exposition à des OPs augmente le risque de développer la MA des années post-exposition (24). D'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson seraient également plus fréquentes chez des personnes exposées à des OPs (25). Des études aux Etats-Unis et en Italie ont montré également que les personnes exposées dans un contexte professionnel à des pesticides ont 2 à 3 fois plus de risque de développer la sclérose latérale amyotrophique (26,27).

b. Hyperexcitabilité neuronale

Lors d'une exposition à des OPs, l'apparition de crises épileptiques spontanées a été observée des semaines voire des mois après l'exposition sur des modèles animaux. Ces observations soulignent ainsi le rôle des OPs dans la mise en place d'un état de mal épileptique (28,29). La compréhension des mécanismes permettant l'apparition d'une épilepsie suite à une exposition aux OPs est primordiale pour mettre en place des thérapies. Une étude a montré dans un modèle rat que suite à une intoxication aux OPs, une élévation de la concentration d'ions calcium a lieu dans les neurones. Cette augmentation participe à la mise en place du statut épileptique dans ce modèle animal (30). McDonough et ses collaborateurs, ont proposé un modèle en trois temps responsable du maintien des crises épileptiques suite à une exposition à un OP. L'excitation neuronale du système cholinergique provoque dans un second temps la libération d'acides aminés excitateurs qui vont renforcer la suractivité neuronale. De plus, les antagonistes muscariniques (atropine) deviennent de moins en moins efficaces et sur le long terme après la survenue de la crise cholinergique, des influx de calcium répétés et la stimulation des récepteurs NMDA sont responsables de la pathologie épileptique (28).

L'épilepsie est une maladie neurologique chronique qui se caractérise par l'activation spontanée, simultanée et excessive d'un nombre très important de neurones dans l'ensemble du cerveau. Ces décharges électriques à répétition sont regroupées sous le terme de décharges paroxystiques. Les crises épileptiques sont donc les signes transitoires évocateurs d'une activité cérébrale anormale et excessive (31). Cette maladie est caractérisée par trois phases : i) un événement épileptique initial ; ii) une période latente où le processus épileptogène se met en place, notamment via la modification structurelle et fonctionnelle du SNC ; iii) l'épilepsie chronique soulignée par l'apparition de crises épileptiques spontanées et récurrentes (32) (Figure 25).

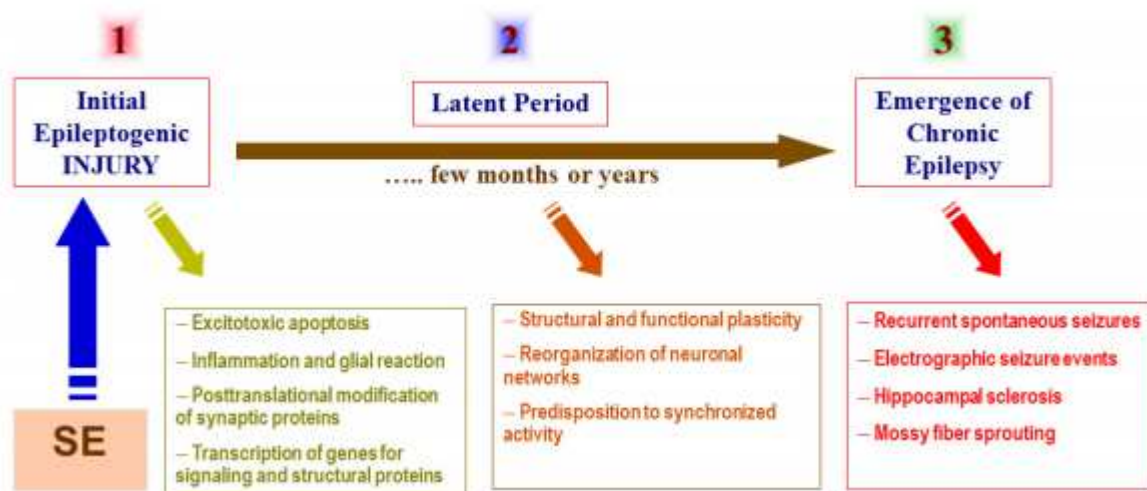


Figure 25: Différentes phases de l'épilepsie. (D'après Reddy et al, 2013)

Pendant la phase latente, il n'y a pas de médicaments pour contrecarrer l'épileptogénèse, ni de thérapies pour prévenir l'apparition d'une épilepsie chronique. De plus, le déclenchement de cette dernière ne peut être que supposée chez les patients. Il est donc primordial d'étudier les mécanismes moléculaires/cellulaires intervenant durant cette période afin de mettre en place des stratégies thérapeutiques pertinentes (33).

Dans le contexte de cette étude durant ma thèse, l'événement initial est l'intoxication à un OP. Même si chez l'Homme l'installation d'une épilepsie chronique suite à une exposition aux OPs n'a pas été prouvée, les survivants d'un empoisonnement présentent une activité épileptiforme électrographique qui persiste pendant des années après l'exposition (34).

IV. Impact sur les fonctions cérébrales

Les OPs engendrent des effets délétères neurologiques/psychiatriques pouvant être persistants sur le long terme (35).

L'utilisation de divers outils tels que des tests comportementaux, d'électrophysiologie, et des méthodes d'imagerie anatomiques (IRM) ou fonctionnelles (TEP), permettent de rendre compte de la perturbation du SNC suite à une intoxication à un OP. Dans les pages suivantes, je vais aborder l'impact d'une exposition à un OP sur le SNC.

1. Etudes cliniques et précliniques

Dans cette partie, je vais présenter les diverses perturbations cérébrales observées chez les personnes et les animaux exposés à des OPs.

a. Troubles psychiatriques et comportementaux

Suite à l'utilisation des OPs dans divers contextes socio-économiques (agriculture, guerre, attentat...), la caractérisation des manifestations cliniques d'une dose unique sur le court terme au sein du SN a été largement étudiée (13). Cependant, l'impact d'une dose unique de NOP sur le long terme reste à approfondir notamment à des doses sous létales. Pour cela, des chercheurs se sont penchés sur la question en effectuant une batterie de tests physiques et psychiatriques sur les membres secouristes et les officiers de police ayant été mobilisés et en contact avec du gaz sarin lors de l'attentat du métro de Tokyo en 1995. L'étude épidémiologique a été conduite trois ans après les faits. Il a été montré que la performance aux tests physiques et mnésiques était moins bonne chez les personnes exposées de manière dose dépendante (forte/faible dose) comparée aux personnes choisies comme contrôles (36).

Une autre étude menée cette fois ci sur des vétérans de la guerre du Golfe ayant été exposés à de faibles doses de sarin et de cyclosarin suite à l'explosion d'un dépôt de munition à Khamisiyah en Iraq a mis en évidence des dysfonctionnements neurocomportementaux. En effet, les participants de l'étude ont eu des difficultés à entreprendre des tâches psychomotrices impliquant une dextérité fine et ont également présenté des troubles visuels 5 ans après l'exposition au neurotoxique (37). Des expositions aux OPs peuvent également engendrer de l'anxiété, de la dépression, des symptômes psychotiques et des déficits de l'attention (38,39). En effet, un

comportement anxiogène transitoire a été observé chez des souris suite à une exposition au soman (40).

Une exposition unique au sarin sous forme de vapeur chez des rats a provoqué des modifications comportementales comme des troubles faisant appel à la mémoire de travail dès cinq semaines jusqu'à six mois post-exposition. Aucune amélioration mnésique n'a été observée tout au long de l'étude (15). Des résultats d'un modèle rat exposé au diisopropyl fluorophosphate (DFP) ont également montré des perturbations de certaines fonctions cognitives (apprentissage, mémoire) jusqu'à deux mois post-intoxication (41). Une étude menée par nos collaborateurs à l'IRBA exploitant des doses sous létales d'OP chez la souris a révélé des perturbations dans la mémoire à court terme suite à l'utilisation du test comportemental de la reconnaissance d'objets. Un mois après l'exposition au nitrophényl isopropyle méthylphosphonate (NIMP), les souris intoxiquées ont présenté une performance exploratoire plus faible que chez les souris contrôles (42).

Les observations obtenues dans ces études suite à des tests neuropsychologiques/comportementaux confirment qu'une exposition unique ou chronique aux OPs est responsable de modifications comportementales tardives. Les perturbations de certaines fonctions cérébrales impliquées notamment dans la motricité et/ou la mémoire, nous laissent penser qu'il peut y avoir des changements fonctionnels et/ou morphologiques au sein du SNC pouvant être à l'origine de la perturbation de ces fonctions. Pour accéder à ces modifications, des études en imageries structurales et fonctionnelles sont précieuses.

b. Modifications des rythmes cérébraux

Pour accéder aux perturbations des rythmes cérébraux l'électroencéphalographie (EEG) est utilisée. Cette technique sert à enregistrer via des électrodes l'activité électrique neuronale. Les signaux électriques à différentes fréquences provenant essentiellement du cortex vont diffuser à travers le Liquide Céphalo Rachidien (LCR), le crâne et la masse grasse (peau) afin qu'ils puissent être enregistrés par des électrodes positionnées sur le crâne (**Figure 26**). Ces électrodes vont enregistrer un signal global provenant de plusieurs sources. Le retranchement des cônes de diffusion de chaque source va permettre de déterminer les zones d'activités cérébrales et les fréquences associées. Cependant l'EEG a une résolution spatiale faible sous tendue par le mélange de toutes les sources de diffusion. Cet examen est très utile pour détecter les sources corticales mais moins sensibles à l'activité sous corticale (43).

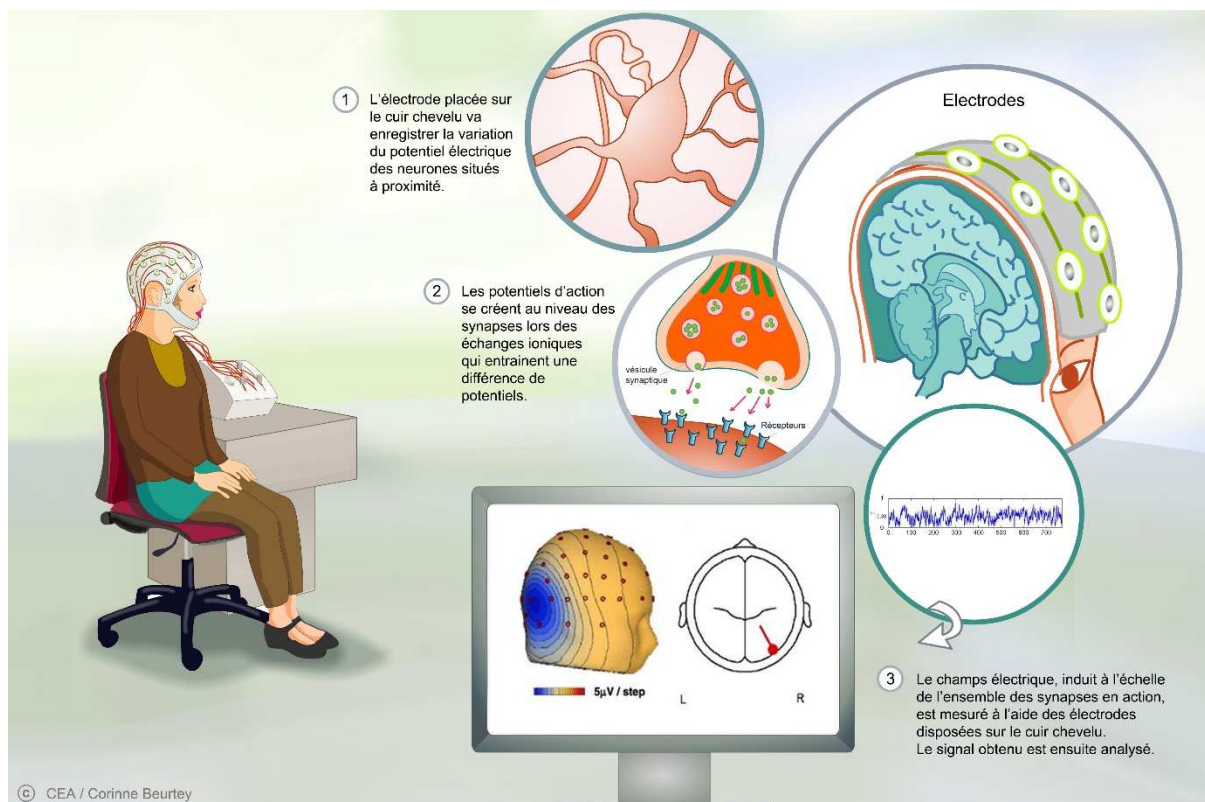


Figure 26: Principe de l'électroencéphalographie (Source www.cea.fr)

Après une exposition à un OP, des études en EEG ont été menées afin de détecter de potentielles perturbations des rythmes cérébraux. Murata et ses collaborateurs, ont démontré que six mois après une intoxication au sarin lors de l'attentat de Tokyo, les victimes étant asymptomatiques ont présenté des réponses EEG anormales suite à des stimulations visuelles et auditives (44). Des examens en EEG ont montré des anomalies des rythmes cérébraux jusqu'à cinq ans post-intoxication sur des personnes présentes à Tokyo lors de l'attaque (34). Une étude réalisée sur des primates non-humains marmosets a démontré qu'à des doses sous létales des perturbations des EEG sont détectables jusqu'à un an post-exposition (45). Des résultats obtenus chez des modèles murins confirment également une altération des EEG suite à une exposition à de faible dose d'OP (42,46).

Ces résultats montrent que même à des doses faibles d'OPs l'activité neuronale peut être perturbée à court et à long terme.

c. Modifications des macrostructures/microstructures du SNC

Pour identifier l'impact de l'exposition des OPs sur la macrostructure cérébrale, des études en imagerie utilisant l'IRM ont été effectuées ces dernières années. Chao et ses collaborateurs, suite à des études en IRM à 1.5 T et 4 T sur des vétérans de la guerre du Golfe, ont montré des changements macroscopiques cérébraux notamment la diminution des volumes de matière grise (MG), de matière blanche (MB) et des hippocampes (47,48). Une autre étude en imagerie effectuée sur des civils victimes des attentats de Tokyo a montré également une diminution des volumes cérébraux de MB et des hippocampes (49).

Afin d'aller plus loin, des études ont permis d'investiguer si en plus des changements macroscopiques comme la diminution des volumes cérébraux observés chez les victimes il y avait également des changements dans la microstructure cérébrale via l'utilisation de l'IRM par tenseur de diffusion (DTI). Cette technique permet d'étudier différents paramètres nous donnant accès à l'orientation et aux mouvements préférentiels des molécules d'eau dans les tissus (50). Des altérations microstructurales chez les vétérans de la guerre du Golfe ont été observées dans l'hippocampe, et la diffusivité moyenne (MD) a été inversement corrélée à la performance du test de mémoire verbale (51). En outre, une étude quantitative volumétrique en IRM a été réalisée sur des vétérans ayant été exposés à de faibles doses de sarin/cyclosarin. Aucune différence volumique significative entre les régions cérébrales des personnes exposées et non exposées n'a été observée par les chercheurs. Cependant, ils ont mis en évidence des changements plus subtils comme des modifications des volumes de matière blanche et un élargissement des ventricules cérébraux (52).

Une seule exposition à de faibles doses d'OPs est alors capable d'engendrer des modifications cérébrales morphologiques persistantes pouvant être à l'origine des troubles cognitifs observables des années après l'exposition.

Des études en IRM ont également été effectuées chez des modèles animaux. Suite à une intoxication aiguë avec DFP à forte dose 4mg/kg, Hobson et ses collaborateurs ont étudié les effets précoces de cet OP sur le SNC. Des altérations structurelles ont été observées dans de nombreuses régions cérébrales comme le thalamus, le cortex piriforme, l'hippocampe, le striatum, et la substance noire suite à des phénomènes de neurodégénérescence (53).

En effet, les observations *in vivo* en IRM conventionnelle ou de diffusion nous donnent un aperçu des altérations structurales qui peuvent être sous tendues par de multiples phénomènes cellulaires (neurodégénérescence, inflammation...).

d. Neuroinflammation

De plus en plus d'études démontrent des évidences expérimentales liant la neuroinflammation aux effets neurotoxiques des OPs sur l'organisme (54). En effet, la neurotoxicité engendrée par les OPs sur le SNC n'est pas entièrement attribuée à une hyperstimulation du système cholinergique suite à l'inhibition des AchE. Duysen et ses collaborateurs, ont démontré que dans un modèle murin n'exprimant pas les AchE, le VX était capable de provoquer des effets toxiques non attribuables à des signes cholinergiques (55). De plus pour observer une crise cholinergique menant au statut épileptique il faut qu'au moins 60 à 80% des AchE soient inhibées (12). La neurotoxicité des OPs peut donc également apparaître en l'absence de l'inhibition des cholinestérases souvent observée lors d'une exposition chronique. Très peu d'études chez l'Homme ont permis d'établir un lien entre des biomarqueurs d'une intoxication à un OP tel que le dosage des AchE dans le sang et des métabolites des OPs retrouvés dans les urines et les déficits comportementaux (56). Ces observations suggèrent bien que la toxicité des OPs n'est pas seulement due à des effets cholinergiques. Que ce soit lors d'une intoxication aiguë ou chronique, la présence d'une réponse inflammatoire non négligeable se met en place.

Des études ont été menées dans des modèles animaux pour investiguer la réponse inflammatoire suite à l'exposition à divers OPs. Un modèle murin intoxiqué au soman a permis d'étudier les effets de l'intoxication sur les neurones matures, les cellules gliales et les progéniteurs neuronaux. Dans les premiers jours suivant l'intoxication, une forte perte neuronale hippocampique suivie d'une importante activation microgliale dans les zones lésées jusqu'à huit jours post-exposition ont été observées. Puis, une forte activité astrocytaire globale a été observée jusqu'à un mois post-intoxication et a persisté dans certaines régions cérébrales jusqu'à trois mois participant ainsi à la formation d'une cicatrice gliale (57). Une étude sur le plus long terme a permis de mettre en évidence l'impact d'une intoxication au DFP à 4mg/kg sur la neuroinflammation et la toxicité cellulaire. Les chercheurs ont mis en lumière un pic de nécrose la première semaine post-intoxication et l'élévation de l'activation des microglies et des astrocytes détectables jusqu'à deux mois post-intoxication (58). Une étude s'est intéressée aux événements inflammatoires précoces dans les 48h après une intoxication au sarin chez le rat. Une élévation de l'ARNm de TSPO est

observée six heures post-intoxication prédisant l'augmentation de la densité des récepteurs TSPO observés 24h post-exposition dans les différentes zones cérébrales analysées par un test de fixation du [3H]PK11195 sur les homogénats de cerveau. L'importante perte neuronale essentiellement due à la nécrose a été associée à une forte astrogliose (59). Des analyses histologiques après une intoxication au sarin chez le rat ont démontré une activation gliale entre quatre et six mois post-intoxication suite à une élévation du niveau de TSPO (PBR dans l'article) (15).

La plupart de ces études ont utilisé des doses létales, cependant toutes ces observations suggèrent que quel que soit l'OP utilisé, une intoxication aigüe engendre rapidement l'apparition de processus neuroinflammatoires notamment suite à l'activation de populations cellulaires spécifiques (microglies/astrocytes). Ce qui est intéressant de souligner c'est que depuis plusieurs années des études ont été menées afin de déterminer le rôle de la neuroinflammation dans la pathogénicité des épilepsies chroniques (60). La neuroinflammation est bien présente dans les zones épileptogènes et participe au maintien des crises. En effet, un modèle murin génétiquement modifié a été développé par Robel et ses collaborateurs présentant une astrogliose chronique et dispersée dans le SNC. Ils ont pu démontrer qu'en absence de pathologie épileptique les souris développaient des crises spontanées accompagnées d'une hyperexcitabilité neuronale. Une astrogliose chronique est donc suffisante pour générer les crises épileptiques. Une activation microgiale modérée a été observée dans le modèle soulignant une étroite communication avec les astrocytes permettant de consolider l'astrogliose (61).

Or, les OPs sont fortement liés au développement du statut épileptique suite à une stimulation exacerbée et incontrôlée des neurones. L'hypothèse qu'une inflammation soutenue et persistante provoquée par une intoxication à un OP pourrait être néfaste sur le long terme est de plus en plus en vogue.

La composante inflammatoire suite à l'activation des microglies et des astrocytes est impliquée dans la genèse et l'entretien des crises épileptiques. L'hyperexcitabilité neuronale résultant en partie de processus neuroinflammatoires est par conséquent à prendre en considération. L'étude de la dynamique d'activation de ces diverses populations cellulaires permet de comprendre leurs implications dans le maintien des crises épileptiques et de tester diverses thérapies diminuant ainsi la composante inflammatoire pour empêcher l'instauration d'un statut épileptique. Dans le cadre d'une intoxication aux OPs, des efforts sont à entreprendre pour étudier la dynamique de la neuroinflammation que ce soit suite à une exposition à forte ou faible doses.

Ces études permettraient de comprendre le rôle de la neuroinflammation sur les effets neurologiques observables à long terme.

Les résultats des investigations menées sur l'implication de processus neuroinflammatoires dans les effets neurotoxiques des OPs démontrent l'utilité de l'imagerie TEP *in vivo*. L'utilisation de la TEP et de radiotraceurs ciblant la TSPO en tant que biomarqueur pour l'activation gliale est primordiale afin de suivre les réactions immunitaires associées à une intoxication que ce soit sur le court ou le long terme.

2. Imagerie TEP suite à une intoxication par un OP pour suivre la réponse inflammatoire

L'hypothèse d'une neuroinflammation persistante après une intoxication avec un OP peut être mise en évidence via l'utilisation de l'imagerie TEP reflétant l'expression de la TSPO biomarqueur de la neuroinflammation ou plus précisément de l'activation gliale.

Flannery et ses collaborateurs ont démontré une inflammation persistante associée à des troubles cognitifs dans un modèle d'intoxication suite à l'injection d'une forte dose de DFP chez le rat. L'imagerie *in vivo* TEP utilisant le (R)-[¹¹C]PK11195 a souligné une augmentation de la fixation du radiotraceur avec un pic à sept jours post-intoxication puis une diminution de la fixation jour 21 mais restant supérieure à la baseline (avant intoxication). La fluctuation du niveau de fixation du radiotraceur était similaire dans les différentes régions cérébrales étudiées (amygdale, thalamus, hippocampe, cortex piriforme et somatosensoriel). De plus, une corrélation positive a été trouvée entre la sévérité des crises épileptiques et la fixation du radiotraceur sur cerveau entier (62). Cette étude avec un radiotraceur TSPO de première génération a montré que le suivi de l'inflammation était possible après une intoxication à un OP (ici le DFP), et que l'activation exacerbée de certaines populations cellulaires comme les microglies et les astrocytes participerait certainement à l'apparition des symptômes cliniques observés. Hobson et ses collaborateurs, ont mis au point une étude longitudinale pour suivre l'évolution de la neuroinflammation utilisant le radiotraceur de seconde génération [¹⁸F]PBR111 dans un modèle rat d'intoxication aiguë au DFP. Une augmentation de la fixation du radiotraceur a été observée jusqu'à 28 jours post-intoxication (**Figure 27**). Les régions cérébrales ayant une augmentation du signal SUV correspondent spatialement à la gliose (activation microglie/astrocyte) observée en histologie (63). Ces deux études ont été réalisées dans des modèles d'intoxication aiguë provoquant des crises épileptiques jusqu'à un mois post-intoxication.

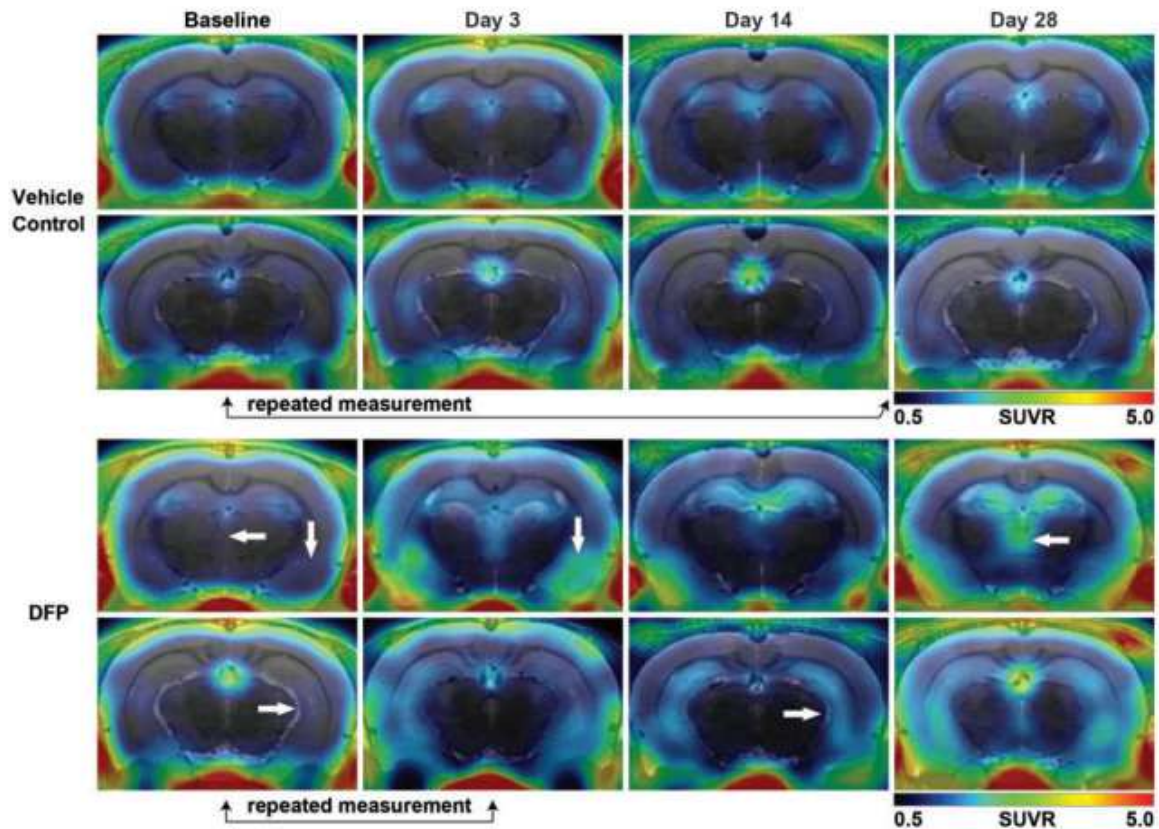


Figure 27: Fixation du $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$ dans un modèle rat intoxiqué au DFP (Hobson et al, 2019).

L'intoxication aiguë au DFP augmente en SUVR (normalisation par le cervelet) du $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$. Images représentatives en SUVR $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$ chez des animaux contrôles (2 rangées supérieures) et des animaux intoxiqués au DFP (2 rangées du bas) au début de l'étude et à 3, 14 et 28 jours post-intoxication. Les flèches blanches indiquent une augmentation de la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$ dans l'hippocampe (flèche vers la droite), le cortex piriforme et l'amygdale (flèche vers le bas) et le thalamus (flèche vers la gauche). Les flèches noires sous les images indiquent les mesures répétées des sessions d'imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$ provenant d'un seul animal intoxiqué par la solution véhicule ou le DFP. Les images mettent en évidence la constance des contrôles au cours de la période d'étude de 28 jours, et l'augmentation rapide du marquage TSPO en $[^{18}\text{F}]\text{PBR111}$ pendant les 3 premiers jours suivant l'intoxication aiguë par le DFP.

En plus de ces deux études précliniques longitudinales en TEP, une récente étude clinique a été menée chez des vétérans atteints du syndrome de la guerre du Golfe et des contrôles sains. Elle a montré une augmentation du signal SUVR (normalisation par le cortex occipital) du radiotracer $[^{11}\text{C}]\text{PBR28}$ dans diverses régions corticales incluant l'aire préfrontale, le cortex moteur primaire et les cortex somatosensoriels chez les vétérans atteints du syndrome de la guerre du Golfe (64).

Rares sont les études en TEP préclinique dans ce contexte d'intoxication à un OP. Aucune étude *in vivo* n'a exploré les effets neuroinflammatoires au-delà du premier mois post-exposition

à un OP et à des doses sous létales. A priori une seule étude clinique a été menée chez des vétérans de la guerre du Golfe en 2020. Cependant à la vue des résultats, l'imagerie TEP *in vivo* ciblant TSPO semble prometteuse pour suivre la neuroinflammation dans ce contexte pathologique. De plus, une meilleure compréhension de la dynamique de la réponse inflammatoire permettrait de tester des approches thérapeutiques.

Afin d'apporter de plus amples informations, dans mon projet de thèse, nous proposons pour la première fois une approche TEP longitudinale *in vivo* suite à l'utilisation d'un modèle d'intoxication à des doses sous létales avec un analogue du gaz sarin (le NIMP) pour pouvoir suivre l'évolution de la neuroinflammation jusqu'à six mois post-intoxication.

V. Traitements d'urgence pour assurer fonctions vitales

Suivant la voie de pénétration des OPs dans l'organisme, une décontamination de la victime doit avoir lieu pour empêcher une trop forte absorption de toxique mais aussi pour stopper sa propagation pouvant affecter d'autres individus dans l'environnement proche. Par voie cutanée des poudres absorbantes sont utilisées pour enlever le maximum de produit actif de la zone contaminée. Si c'est par ingestion, un lavage gastrique dans les 30 minutes suivant l'intoxication est à préconiser.

Les traitements développés suite à une intoxication aux OPs sont majoritairement symptomatiques afin de contrecarrer les effets sur le court terme. Lors d'une intoxication aiguë, il est primordial d'agir au plus vite dès l'apparition des premiers symptômes. Le traitement d'urgence à administrer vise à assurer les fonctions vitales et éviter la mort de l'individu. Cela va permettre de faire face à d'éventuelles détresses respiratoires, un coma ou des convulsions. Plus le traitement sera administré tôt, plus il sera efficace. L'utilisation combinée d'atropine et d'oximes permet de contrecarrer les effets d'une hyperactivation du système cholinergique entraînant in fine la mort par asphyxie (65).

En effet, l'atropine est un antagoniste des récepteurs muscariniques rentrant alors en compétition avec l'Ach qui quant à elle est un agoniste de ces récepteurs. Elle va agir en limitant le bronchospasme qui est une contraction des poumons responsable d'une obstruction temporaire des voies respiratoires et sur les sécrétions bronchiques (66).

Les oximes sont des molécules ré-activatrices des AchE inhibées qui permettent de cliver la liaison enzyme-inhibiteur mais aussi l'inhibiteur. Ces molécules réactivent les AchE et retardent leurs vieillissements pour qu'elles soient à nouveau capable d'hydrolyser de l'Ach afin de diminuer son taux au niveau du SN. L'oxime utilisée en France est la pralidoxime (2-PAM), elle va cliver la liaison entre l'OP et la sérine de l'ACHé permettant ainsi la libération du site actif (**Figure 28**) (67).

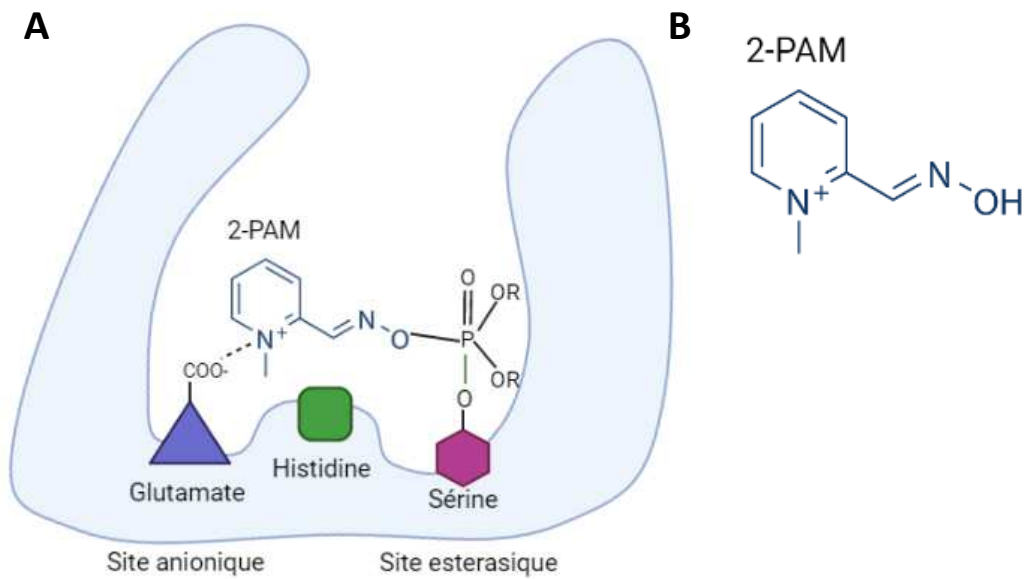


Figure 28: Réactivation d'une AChE par la pralidoxime (2-PAM).

Réactivation de l'enzyme dans la gorge où se situe la triade catalytique et l'inhibiteur (A). Formule chimique de la pralidoxime (B).

Cependant, les oximes chargées positivement passent très peu la BHE par conséquent la réactivation de l'AChE au niveau du SNC est très limitée. Depuis plus de 60 ans, aucun réactivateur de l'AChE n'était capable de passer efficacement la BHE, toutefois une étude préclinique récente a montré que certaines oximes étaient capables de passer la BHE afin de réactiver l'AChE centrale afin de limiter les dommages cérébraux induits par certains OPs (68).

Des anticonvulsivants sont également utilisés lors d'une intoxication sévère. La classe de molécules est les benzodiazépines comme le Diazépam. Cette molécule permet de réduire la durée et l'intensité des convulsions ainsi que les fasciculations musculaires (69).

Naturellement, la prise en charge des symptômes cliniques suite à une intoxication aiguë a été beaucoup étudiée afin d'empêcher la mort des individus, et certains aspects font l'objet de recherches actives pour permettre de réactiver les AChE centrales. Cependant, il est nécessaire de mettre en place d'autres traitements afin de contrecarrer les effets des OPs sur le SNC sur le long terme.

VI. Besoin de traitements neuroprotecteurs

A la vue des études cliniques et précliniques, il est pertinent de développer des approches thérapeutiques permettant de contrecarrer les conséquences neurologiques tardives post-exposition à un OP. De nombreuses études s'appuient sur les mêmes hypothèses qui ont été faites dans des modèles expérimentaux d'épilepsie. En effet, un lien direct entre une exacerbation d'une réponse inflammatoire a été tenue pour responsable de la genèse ou du maintien d'une épilepsie chronique engendrant des troubles neurologiques sur le long terme (60). Dès lors, les recherches se sont focalisées sur la mise au point de stratégies capables de lutter contre une réponse inflammatoire indésirable.

Des études ont été menées en utilisant des molécules anti-inflammatoires. Un inhibiteur de l'activation microgliale (la minocycline) a été testé dans un modèle murin ayant développé un statut épileptique suite à l'injection d'acide kainique en intracérébral. Dans ce modèle, une activation importante rapide et exagérée des microglies lors de crises a été observée. Cette hyperactivation microgliale joue un rôle clé dans l'induction des futures crises épileptiques. Le traitement utilisant la minocycline a permis de réduire l'activation microgliale et de réduire le déclenchement spontané de crises plus tardivement (70). La minocycline est connue pour avoir des effets anti-inflammatoires, anti-oxydatifs et anti-apoptotiques. De plus, la minocycline est capable d'inhiber la polarisation des microglies en phénotype M1 dit « pro-inflammatoire (71). Une autre étude a montré que malgré ces propriétés, cette molécule n'était pas capable de contre carrer l'épileptogénèse chez un modèle de rats épileptiques (72). Ces résultats contradictoires ont permis de mettre en lumière la complexité des réponses inflammatoires lors de la pathologie épileptique. Depuis, une approche scientifique a testé la combinaison de plusieurs molécules anti-inflammatoires permettant ainsi d'agir sur diverses voies cellulaires chez des ratons épileptiques. Le cocktail comprenait un antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1, un inhibiteur de la cyclooxygénase-2 (COX-2), et un inhibiteur de l'activation microgliale (minocycline). L'administration d'un seul de ces anti-inflammatoires n'était pas capable d'atténuer les dégâts observés au niveau de l'hippocampe et de réduire les crises épileptiques spontanées. Or, ils ont observé des effets bénéfiques lorsque ces molécules sont utilisées conjointement (73).

Etant donné que de nombreux modèles d'intoxication aux OPs présentent un statut épileptique suivi de l'apparition de crises épileptiques spontanées, l'hypothèse d'inhiber ou de modifier la réponse inflammatoire prend alors tout son sens. De plus en plus d'agents anti-inflammatoires semblent avoir un effet neuroprotecteur après une intoxication aigüe aux OP. La

majorité des études testant des thérapies anti-inflammatoires ont été, à ce jour, réalisées sur des modèles d'intoxication aux OPs provoquant un état de mal épileptique (74). Des approches thérapeutiques sont également testées dans des modèles rongeurs répliquant le syndrome de la guerre du Golfe notamment suite à l'utilisation de la curcumine qui a démontré de multiples bénéfices comme une amélioration de la neurogenèse, une diminution de l'inflammation et du stress oxydatif et une restauration des dysfonctions mitochondriales. Ils ont également proposé que ces améliorations seraient responsables d'une meilleure capacité mnésique observée dans ce modèle suite au traitement (75). La curcumine a montré des capacités à diminuer l'activation des cellules immunitaires observée par la diminution de marqueurs cellulaires (Iba1, GFAP, TSPO) dans un modèle murin d'activation microgliale chronique (76). Suite à ces observations, des chercheurs proposent d'utiliser le potentiel de la curcumine pour soigner les vétérans atteints du syndrome de la guerre du Golfe (77). Des études sont encore nécessaires afin de trouver un traitement prometteur pour cibler la neuroinflammation dans ce contexte pathologique d'intoxication à un OP.

Étonnamment, un autre traitement au Montelukast (MK) a montré des propriétés anti-inflammatoires et a été testé dans diverses conditions pathologiques pour limiter les effets délétères observables dans le SNC. Le MK est un médicament d'ores et déjà prescrit pour le traitement de l'asthme et des allergies. Il fait partie de la classe des antagonistes aux récepteurs des leucotriènes. Son utilisation a montré une amélioration des symptômes cognitifs et une diminution de la neurotoxicité induite dans un modèle murin d'injection de streptozotocine. Les résultats suggèrent que le MK est capable d'améliorer les capacités mnésiques et d'inhiber la neuroinflammation et l'apoptose (78). Dans un modèle rat parkinsonien, le traitement avec ce dernier a mis en évidence une diminution de l'activation microgliale soulignant un effet anti-inflammatoire (79). Chez des souris présentant des crises épileptiques, l'utilisation du MK augmente la latence de l'apparition des crises (80). Chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, le MK améliore les performances mnésiques par l'inhibition de la neuroinflammation et de l'apoptose en modulant la signalisation cellulaire induite par les récepteurs cystéinyl-leucotriènes (CysLT1R), suggérant ainsi que les antagonistes de ces récepteurs pourraient être une nouvelle piste thérapeutique dans la MA (81). Des chercheurs ont montré qu'une downregulation des CysLT1R via l'utilisation d'un antagoniste le pranlukast (proche du MK) durant 21 jours était capable de réduire l'activation microgliale, les taux d'IL- β et de TNF- α qui sont des cytokines pro-inflammatoires (82). Le MK serait même capable d'induire une polarisation des macrophages en type M2 « anti-inflammatoire » (83). Une autre étude a montré que même dans un contexte non-

pathologique un traitement au MK améliore les fonctions mnésiques et d'apprentissage chez des rats âgés (84).

Ces études précliniques utilisant le MK sur d'autres pathologies que l'asthme montrent le potentiel du MK en tant qu'anti-inflammatoire, qu'antioxydant, et qu'anti-apoptotique. Dans cette étude de ma thèse nous allons tester ces propriétés décrites pour le MK sur notre modèle d'intoxication murin.

VII. Modèles animaux

Due à la difficulté de la mise en place d'études longitudinales chez l'Homme du fait de l'exposition imprévisible des OPs sur l'organisme, différents modèles animaux ont été mis en place afin de permettre d'étudier l'évolution des manifestations comportementales, fonctionnelles et/ou structurelles intervenant à des stades précoces et/ou tardifs suite à l'exposition à un OP.

Le développement de modèles animaux est primordial pour comprendre les effets d'une intoxication à un OP sur le SNC et SNP afin de mettre en place et de tester des mesures médicales que ce soit à court ou à long terme. L'étude de l'impact des OPs a été effectuée sur un large spectre d'espèces que ce soit en conditions naturelles (environnementales) ou de laboratoires avec des modes d'administrations divers imitant les différentes voies de pénétration des OPs dans l'organisme (**Figure 29**) (85).

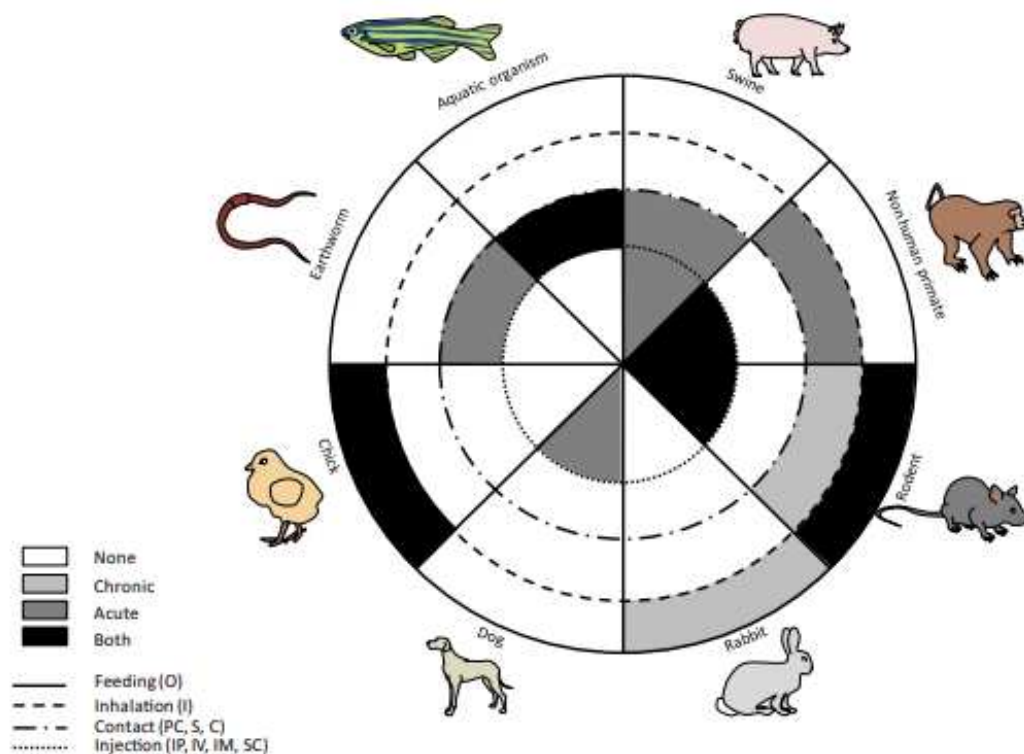


Figure 29: Diversité des modèles animaux utilisés dans le cadre d'une intoxication à un OP. (D'après Poirier et al, 2018)

Modèles animaux utilisés pour évaluer la toxicité des Ops suivant différents modes d'exposition et d'administration (nourriture (O), inhalation (I), contact (PC, S, C) et injection (IP, IV, IM, SC).

Le modèle restant le plus utilisé est le modèle murin dû à la facilité de mise en place des techniques expérimentales notamment d'administration de l'OP. Les porcs par exemple sont beaucoup utilisés pour des études sur la pénétration cutanée de certains OPs comme le VX (86). Plus rarement, des primates non-humains sont utilisés pour tester certaines thérapies en cours de développement comme des oximes capables de passer la BHE (87). Ces deux espèces sont également très proches de l'Homme pour permettre des études translationnelles. Les rongeurs les plus utilisés en laboratoire dans des modèles d'intoxication sont les cochons d'Inde et les rats. Cependant, leur sensibilité à une intoxication est différente. Les rats sont moins sensibles à une intoxication que les cochons d'Inde. Les modèles animaux qui semblent être les plus proches de l'Homme suite à une intoxication sont les primates non humains et les cochons d'Inde car ils ont de faibles taux de d'enzymes carboxylesterases circulante similaire à l'Homme. C'est une enzyme capable de métaboliser et d'inactiver les OPs (88). Le choix de l'espèce pour les études dépend bien évidemment de la question scientifique posée et de la praticité de la mise en place du protocole expérimental.

Afin de mieux identifier le lien entre la neuroinflammation et les séquelles qui apparaissent sur le long terme suite à une intoxication à des doses sous létales d'OPs, des modèles précliniques sans manifestations de crises épileptiques sont nécessaires.

OBJECTIFS

L'objectif de cette étude est de découvrir par imagerie moléculaire les effets sur le SNC à court et long termes de l'intoxication avec un analogue du sarin (neurotoxique de guerre), le nitrophényl isopropyle méthylphosphonate (NIMP) (89). L'étude vise à établir de meilleures connaissances sur les atteintes du SNC, à la suite de l'intoxication aux OPs afin de :

- i) Déterminer une cinétique de l'effet neuroinflammatoire induit par l'intoxication aux OPs par imagerie
- ii) Déterminer une nouvelle cible thérapeutique
- iii) Déterminer les fenêtres d'action adaptées d'un traitement neuroprotecteur.

Pour cela, des examens d'imagerie TEP utilisant des radiotraceurs spécifiques des cibles neurologiques (p. ex. neuroinflammation, état de la BHE), sont réalisés chez des animaux anesthésiés. Plus précisément, les examens sont réalisés chez des souris « avant et après intoxication au NIMP » et, dans un deuxième temps, chez des animaux « intoxiqués au NIMP » ayant reçu un traitement neuroprotecteur ou un placebo (« contrôle »).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Modèle d'intoxication au NIMP

1. Détermination de la DL50

Nos collaborateurs de l'IRBA ont mis en place un modèle murin d'intoxication avec un analogue du gaz sarin : le NIMP (42). Pour cela, la dose létale 50 (DL50) de la molécule a dû être déterminée selon la méthode suivante :

La procédure "up-and-down" est utilisée telle qu'elle a été définie par l'OCDE (directive 425). Elle permet d'effectuer une mesure de la toxicité aiguë d'une substance chimique. En effet, cette approche, permet de déterminer la dose de la substance étudiée provoquant la mort de 50% des souris en 24h suite à l'injection unique du composé. Si l'animal survit, la dose du composé testé est augmentée d'un pas de 1.1 pour le prochain animal, ou cette dose est réduite du même pas si l'animal meurt. Chaque résultat de survie ou non est rentré dans un programme qui détermine l'arrêt du protocole si les données sont suffisantes pour déterminer la DL50 de la molécule (logiciel : Aot425stat Program).

Pour la détermination de la DL50, une injection unique de toxique à un volume de 10 ml/kg (pour une souris de 40g = 400µl) est réalisée en sous cutanée.

La surveillance de l'animal est assurée en continu durant les 2 heures post-intoxication puis toutes les 2 heures jusqu'à 8 heures post-intoxication et à 24h. Le paramètre étudié est la mort ou non de l'animal selon la dose de toxique injecté. La solubilité du composé et son taux de pureté lors d'une nouvelle synthèse pouvant être variables, à chaque nouveau lot une DL50 doit être déterminée. Dans notre cas, un seul lot de synthèse de NIMP a été utilisé.

La détermination de la DL50 est réalisée sans traitement analgésique pour ne pas biaiser les résultats. En effet, des analgésiques peuvent impacter la survie des animaux par leurs actions sur le système cardio-respiratoire. Le niveau de souffrances infligé à l'animal est susceptible d'être important puisqu'il s'agit d'un test de toxicité et que l'emploi d'anesthésique et d'analgésique est proscrit. Plus la DL50 est faible plus la substance est toxique.

Pour le lot de NIMP utilisé dans cette étude la DL50 est de 0,63 mg/kg.

II. Doses utilisées (0.5 DL50 versus 0.9 DL50)

Deux doses de toxiques seront utilisées pour cette étude 0.5 DL50 (soit 0.315 mg/kg) et 0.9 DL50 (0.567 mg/kg). Des groupes de rongeurs ont été intoxiqués à une dose convulsivante (0.9 DL50 ; en tant que « groupe d'intoxication contrôle positif »), une dose qui a induit des convulsions périphériques mais sans crises épileptiques. D'autres groupes de rongeurs ont été intoxiqués à une dose faiblement symptomatique (0.5 DL50, en tant que « groupe d'intoxication asymptomatique ») induisant peu ou pas de modifications cliniques (fasciculations ou tremblements légers, EEG stable). En outre, des groupes de souris contrôles via une injection de NaCl ont été utilisés afin de déterminer l'effet de l'âge sur l'évolution de la neuroinflammation.

III. Injection en sous cutanée

Les solutions d'intoxication ont été fraîchement préparées les jours des sessions d'intoxication. Pour cela, le NIMP (10 mg/kg) a été dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%). La solution contrôle était uniquement composée de NaCl sans la substance active.

Au total tout au long de l'étude, 127 souris Swiss mâles âgées de 9 semaines libres de leurs mouvements ont reçu une injection unique en sous cutanée (10 mL/kg) soit du toxique NIMP (0.5 DL50 ou 0.9 DL50) soit d'une solution contrôle. Les injections ont été effectuées par deux manipulateurs, l'un chargé de distraire l'animal pendant que le second à l'aide d'une pince tendait la peau de l'animal afin d'injecter la solution via une seringue de 1 mL. Une fois injecté l'animal était isolé dans une cage.

Tout matériel de laboratoire ayant été en contact avec l'OP a été trempé dans la soude alcoolique afin d'inactiver la molécule.

IV. Symptômes

Pour chaque session d'intoxication, les souris ont été observées pendant une heure post-intoxication afin de recenser les symptômes évocateurs et spécifiques d'une intoxication à l'OP (signes cholinergiques). Le temps d'apparition des diverses manifestations cliniques a été soigneusement noté pour avoir une fiche d'intoxication propre à chaque animal. Cela a permis d'étudier par la suite la présence/absence des symptômes et leur délai d'apparition suivant la dose du toxique. Puis les souris ont eu un suivi de leur état de santé jusqu'à 7 jours post-intoxication.

V. Imagerie TEP longitudinale au [¹⁸F]DPA-714

1. Phase 1 : Détermination d'une fenêtre thérapeutique d'action

La mise en place d'une étude longitudinale en imagerie TEP au [¹⁸F]DPA-714 permet de suivre une évolution de la neuroinflammation au cours du temps et de déterminer l'impact d'une intoxication au NIMP sur cette dernière (**Figure 30**).

Des examens TEP utilisant le [¹⁸F]DPA-714 ont été effectués sur 51 souris Swiss intoxiquées (n=27 en 0.5 DL50 ; n=24 en 0.9 DL50) et 20 souris contrôles. Un examen baseline a été fait pour toutes les souris afin de déterminer l'expression basale de la TSPO. Puis, les souris ont été imagées à différents temps post-intoxication (J1, J3, J7, J14, 1M, 3M, 6M). Brièvement, sous anesthésie via l'isoflurane (2-2,5% dans de l'O₂), un cathéter a été posé au niveau de la veine caudale de l'animal. Puis, les animaux anesthésiés ont été transférés sous un scanner microPET, le cerveau centré au milieu du champ de vue de la caméra (Inveon, microPET ; résolution spatiale 1,6mm ; Siemens Healthcare, Knoxville, TN, USA). Dès l'injection par i.v. du [¹⁸F]DPA-714 (dose moyenne = 6,48 +/- 1,3MBq) une acquisition TEP dynamique 60 minutes a été réalisée sous anesthésie maintenue par un masque facial (1,5-2 % d'isoflurane). Au total 227 examens TEP ont été réalisés au cours de cette phase.

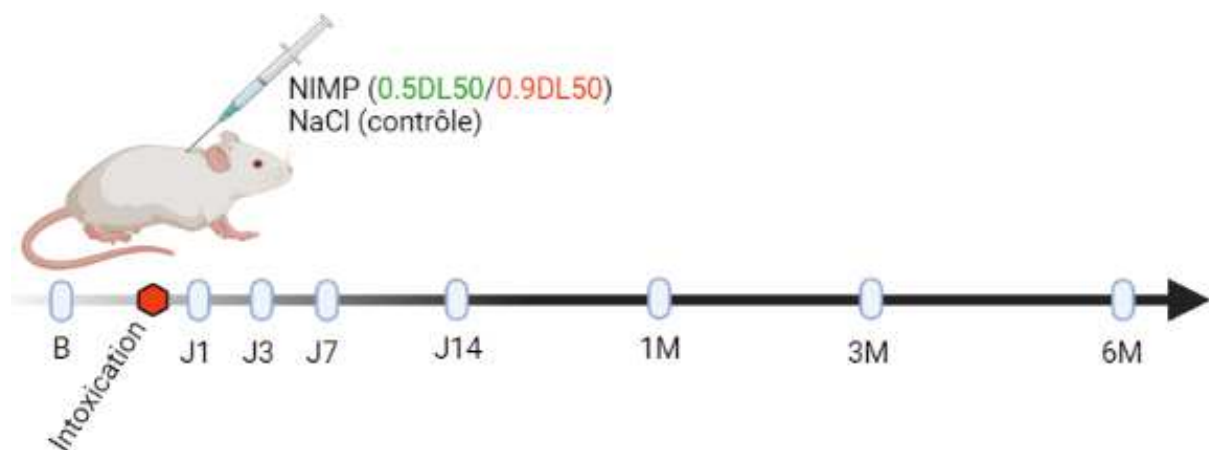


Figure 30 : Schéma chronologique de l'étude longitudinale en imagerie TEP utilisant le [¹⁸F]DPA-714 dans un modèle murin d'intoxication à un OP (NIMP).

Les images TEP dynamiques ont été reconstruites par l'algorithme 3D OSEM/MAP et corrigées pour l'atténuation, les coïncidences aléatoires et la diffusion. La taille du voxel était de 0,2 x 0,2 x 0,2 mm³. Les images TEP du cerveau ont été corrigées pour tenir compte de la

décroissance radioactive, de la dose injectée et du poids corporel. La distribution cérébrale du [¹⁸F]DPA-714 a été exprimée en valeurs standard de captation, avec SUV= activité tissulaire (KBq/cc)/[dose injectée (KBq)/poids corporel (g)]. Les images TEP ont ensuite été normalisées spatialement par l'utilisation du template de souris [¹⁸F]FDG (Mirrione et al, 2007) en utilisant le logiciel Pmod (version 3.8, PMOD Technologies Ltd, Zurich, Suisse). Puis des régions cérébrales d'intérêts ont été déterminées par l'utilisation de l'Atlas VOI Ma-Benveniste-Mirrione au total 15 régions (cortex, thalamus, cervelet, cerveau antérieur basal, hypothalamus, tronc cérébral, matière grise centrale, colliculi supérieur, bulbe olfactif, striatum, hippocampe, amygdale, mésencéphale, colliculi inférieur, cerveau entier).

Pour chaque région cérébrale (cerveau total, hippocampe, cortex, cervelet) des 227 examens, les AUC (Aire sous la courbe) ont été calculées et comparées. La représentation des résultats est faite selon le pourcentage de changement comparé à la baseline $((AUC_t - AUC_{baseline}) / AUC_{baseline})$. Avec t les différents temps post-intoxication.

2. Phase 2 : traitement neuroprotecteur (Montelukast)

a. Dose de MK et administration

La deuxième phase consiste à étudier l'efficacité d'un traitement pharmacologique neuroprotecteur, le MK un antagoniste des récepteurs leucotriènes sur des souris ayant reçu des doses asymptotiques de NIMP (0.5 DL50). Le traitement associé au suivi en imagerie a été réalisé sur un mois (**Figure 31**).

Afin de mener à bien cette deuxième phase, un examen TEP au [¹⁸F]DPA-714 a été effectué en baseline avant l'intoxication, puis 12 souris ont été intoxiquées avec 0.5 DL50 et 12 souris ont reçu une injection contrôle de NaCl.

La définition de différents groupes expérimentaux a été nécessaire afin de mettre en évidence un potentiel effet thérapeutique. Quatre groupes de souris (n=6 par groupe) ont été traitées par gavage *i)* Ctrl-vehicle; *ii)* 0.5 DL50-vehicle; *iii)* Ctrl-MK ; *iv)* 0.5 DL50-MK. La première dose a été reçue deux heures post-intoxication puis trois fois par semaine (Lundi, Mercredi, Vendredi) pendant un mois soit avec une dose de 10mg/kg de MK (Montelukast sodium, Sigma Aldrich) ou une solution contrôle (même solvant que le médicament neuroprotecteur mais sans dose active).

Tous les jours de traitement, les solutions de gavage ont été fraîchement préparées. La poudre de MK a été pesée afin d'obtenir une solution stock de 3mg/mL dans 10% EtOH ajusté avec du NaCl 0.9% (85). Une fois le traitement terminé, un deuxième examen TEP au [¹⁸F]DPA-714 a été réalisé. Les 48 examens résultants des acquisitions TEP ont été traités comme vu précédemment (phase 1).

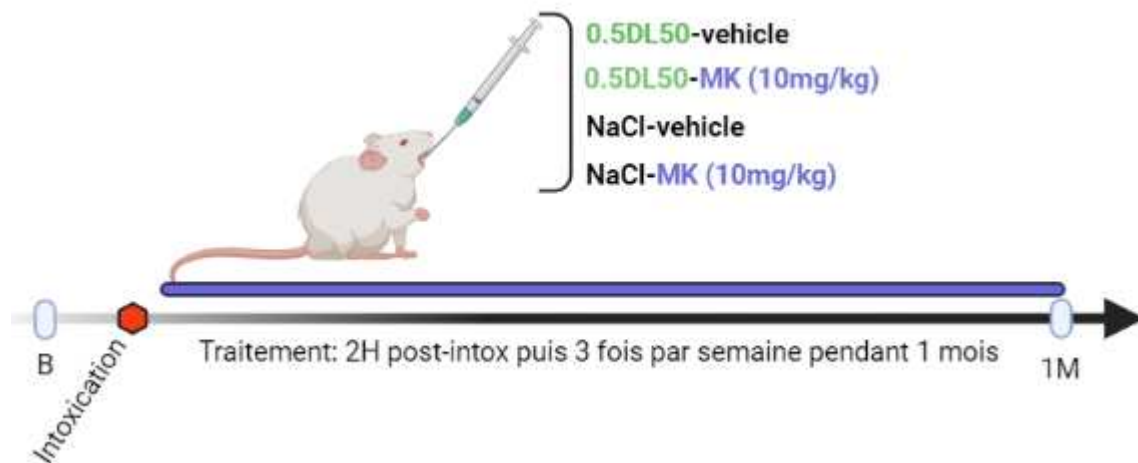


Figure 31: Schéma récapitulatif du suivi en imagerie suite au traitement protecteur.

VI. Immunohistofluorescence

Pour confirmer les observations *in vivo*, à la fin de leur dernier examen TEP, les animaux ont été anesthésiés profondément avec kétamine/xylazine (180 mg/kg kétamine + 10 mg/kg xylazine *i.p.*). La qualité de l'anesthésie a été vérifiée par la perte de réflexes nociceptifs testée par le pincement des pattes. Puis la peau, la couche musculaire et la cage thoracique ont été découpées en limitant les saignements. Après dégagement du péricarde, un microperfuseur a été introduit dans le ventricule gauche jusqu'à la crosse aortique, l'oreillette droite a été sectionnée et la perfusion a été réalisée avec 20 ml de sérum physiologique (91). Le cerveau a été ensuite prélevé en vue d'études *ex vivo*. La perfusion élimine les protéines et d'autres molécules au sein des vaisseaux sanguins qui pourraient augmenter des liaisons non-spécifiques lors des études *ex vivo*.

Des coupes de cerveaux de 20 µm ont été effectuées par le dispositif cryostat Leica (CM3050S).

Puis des marquages en immunofluorescence ont été effectués pour déterminer l'origine cellulaire (microglies/astrocytes ?) de l'expression et de la dynamique d'expression de TSPO au cours du temps.

Les coupes ont été fixées 15 minutes dans du Paraformaldéhyde 4%, puis un lavage au Phosphate Buffer Saline (PBS) a été effectué avant de bloquer l'action du PFA avec une solution de NH₄Cl (50mM) dans du PBS pendant 5min.

Un deuxième lavage au PBS a eu lieu, suivi par une étape de saturation des sites non spécifiques avec une solution de BSA 5% ; Tween 80, pendant 1h30.

L'anticorps primaire dirigé contre TSPO (EPR5384, sigma) ; cd11b (AbIN284101) et GFAP (AB4674) dilué au 1/500 ème a été mis en contact avec les coupes pendant une heure.

Les anticorps secondaires AF488 goat anti-rabbit ; AF-546 goat anti-rat et AF647 goat anti-chicken ont été incubés pendant une heure.

VII. Analyse des données et statistiques

Analyse TEP :

Les AUC calculées par la méthode des trapèzes des courbes cinétiques de la fixation du radiotracteur exprimées en SUV des trois régions cérébrales (cerveau entier, cortex et hippocampe) ont été comparées pour chaque groupe en utilisant un test one way ANOVA à effet-mixte avec données appariées. Dans ce modèle, chaque temps post-intoxication a été comparé à la baseline suite à l'utilisation de test post-hoc de Dunnett. Les résultats ont été présentés en pourcentage de changement comparé à la baseline.

Pour la deuxième phase des ANOVA à deux facteurs avec mesure répétées ont été effectuées sur les valeurs AUC.

Le pourcentage de variation des données AUC intra-groupe selon les temps a été calculé (CV= (écart-type/moyenne) x 100

RÉSULTATS

I. Etude comportementale

Sur les 72 souris intoxiquées avec une dose de NIMP (42 en 0.5 DL50 ; 30 en 0.9 DL50) et les 51 souris contrôles, une observation comportementale a été effectuée dès l'injection et pendant une heure pour recenser le pourcentage et le délai d'apparition de 18 symptômes caractéristiques d'une intoxication au NIMP.

A des doses sous létales de NIMP (0.5 DL50 et 0.9 DL50), les souris ont présenté une symptomatologie commune notamment avec l'apparition de fasciculations (petits tremblements involontaires des oreilles et de la peau) ; mâchouillement ; bâillement ; chute du tonus musculaire (CTM) ; dos vouté ; head bobbing (mouvements amples de la tête synchronisés avec les mouvements respiratoires) ; spasmes et queue en S. Dans au moins 60% des cas, l'intoxication a provoqué chez les souris 0.5 DL50 l'apparition de fasciculations ; mâchouillement ; bâillement et dos vouté. Plus rarement les souris ont contracté d'autres symptômes tels que CTM ; head bobbing ; spasmes ; queue en S variant respectivement de 5% à 33% d'apparition. Les souris 0.9 DL50 quant à elle en plus de ces derniers ont présenté d'autres troubles comportementaux comme des tremblements généralisés, des convulsions courtes, des crises convulsives, rigidité membres antérieurs/postérieurs que l'on a retrouvé dans plus de 60% des cas (**Figure 32**).

Le délai d'apparition des symptômes a également été étudié et la majorité des symptômes apparaissent dès les 30 premières minutes post-intoxication quel que soit le groupe.

A la vue des résultats, la symptomatologie suite à une intoxication à un OP, ici au NIMP, suit un schéma d'apparition bien défini. Les symptômes communs observables dans les deux groupes sont parmi les premiers à faire leur apparition puis rapidement les autres modifications comportementales plus graves spécifiques aux 0.9 DL50 sont observées entre 20 et 40 min post-intoxication (**Figure 33**).

Pour confirmer l'impact de l'intoxication sur l'analyse comportementale des souris contrôles ont aussi été observées, et aucun des symptômes n'a été relevé (résultats non montrés).

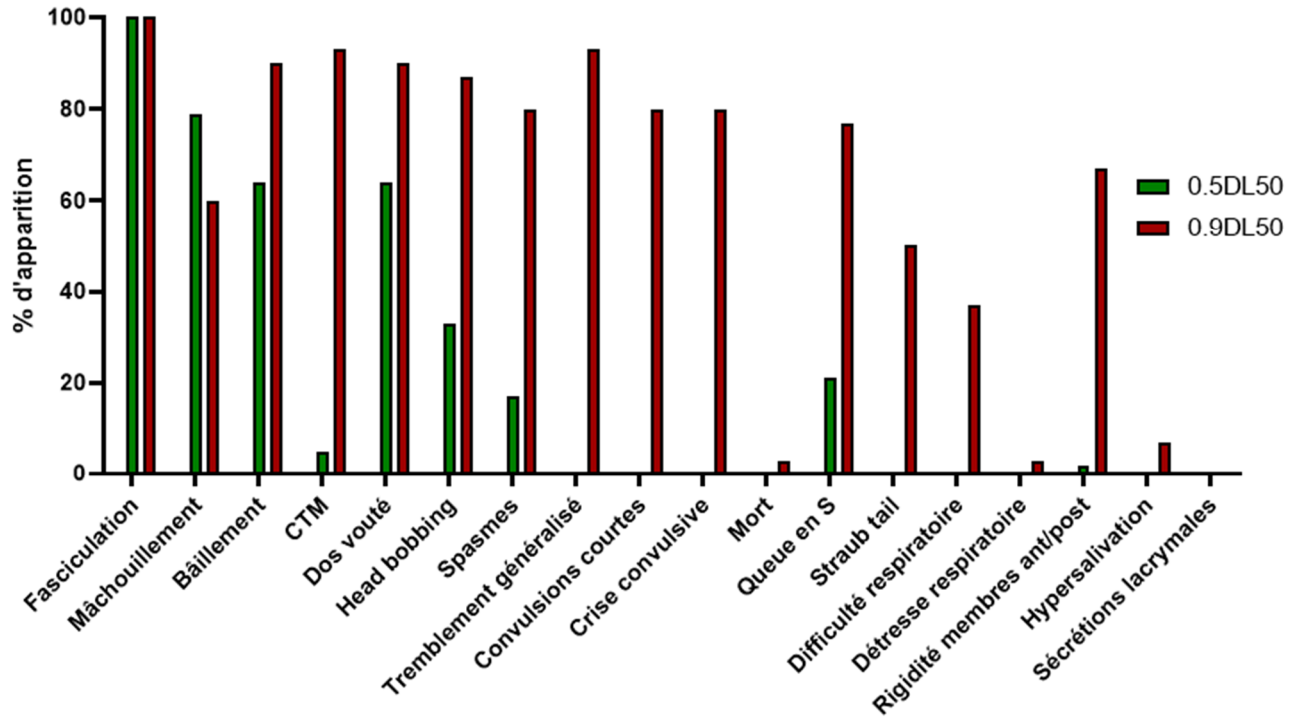


Figure 32: Symptomatologie suite à l'intoxication avec le NIMP.

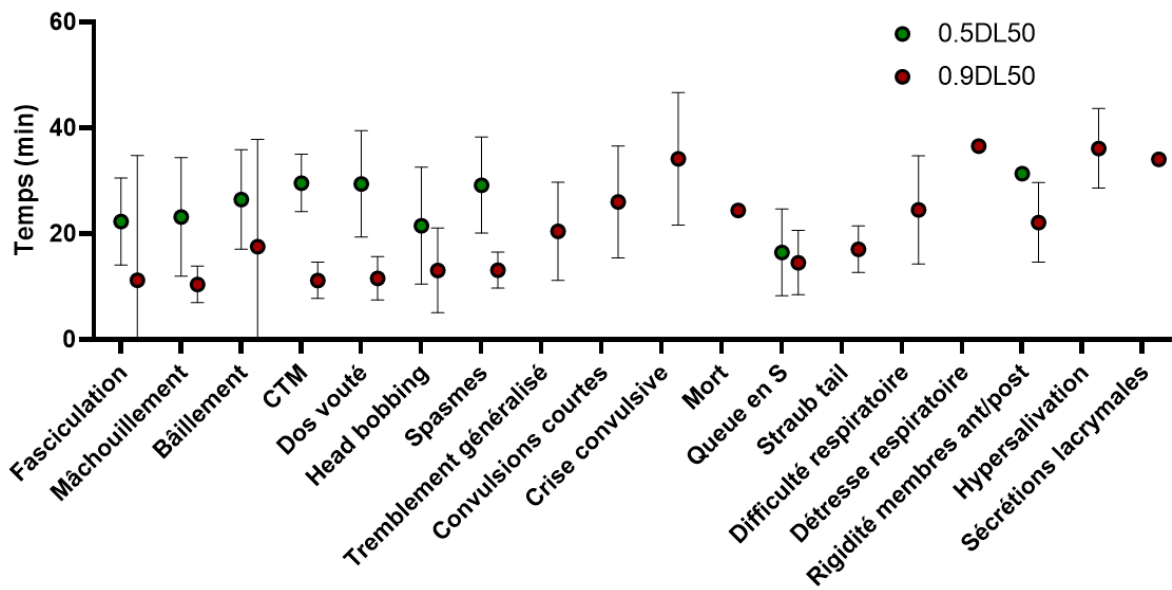


Figure 33: Délai d'apparition des modifications comportementales selon la dose sous létale de NIMP utilisée

II. Suivi de l'évolution de la neuroinflammation après une intoxication au NIMP

1. Fixation du [^{18}F]DPA-714

Des calculs des coefficients de variation (CV) des données AUC de chaque groupe et aux différents temps ont été effectués afin d'accéder à la dispersion relative des données autour de la moyenne. Sur le cerveau entier, quel que soit le groupe le CV ne dépasse pas les 20% aux différents temps. Au niveau du cortex, le CV est compris entre 10 et 21,4% dans le groupe 0.5 DL50, 13,4% et 23,4% pour le groupe 0.9 DL50 et enfin 10 et 19,7% pour le groupe contrôle. Le CV varie de 8,8 à 22,5% pour la faible dose, de 15,4 à 21,1 pour la forte dose et de 10,3 à 21,1% pour les souris contrôles (Figure 34).

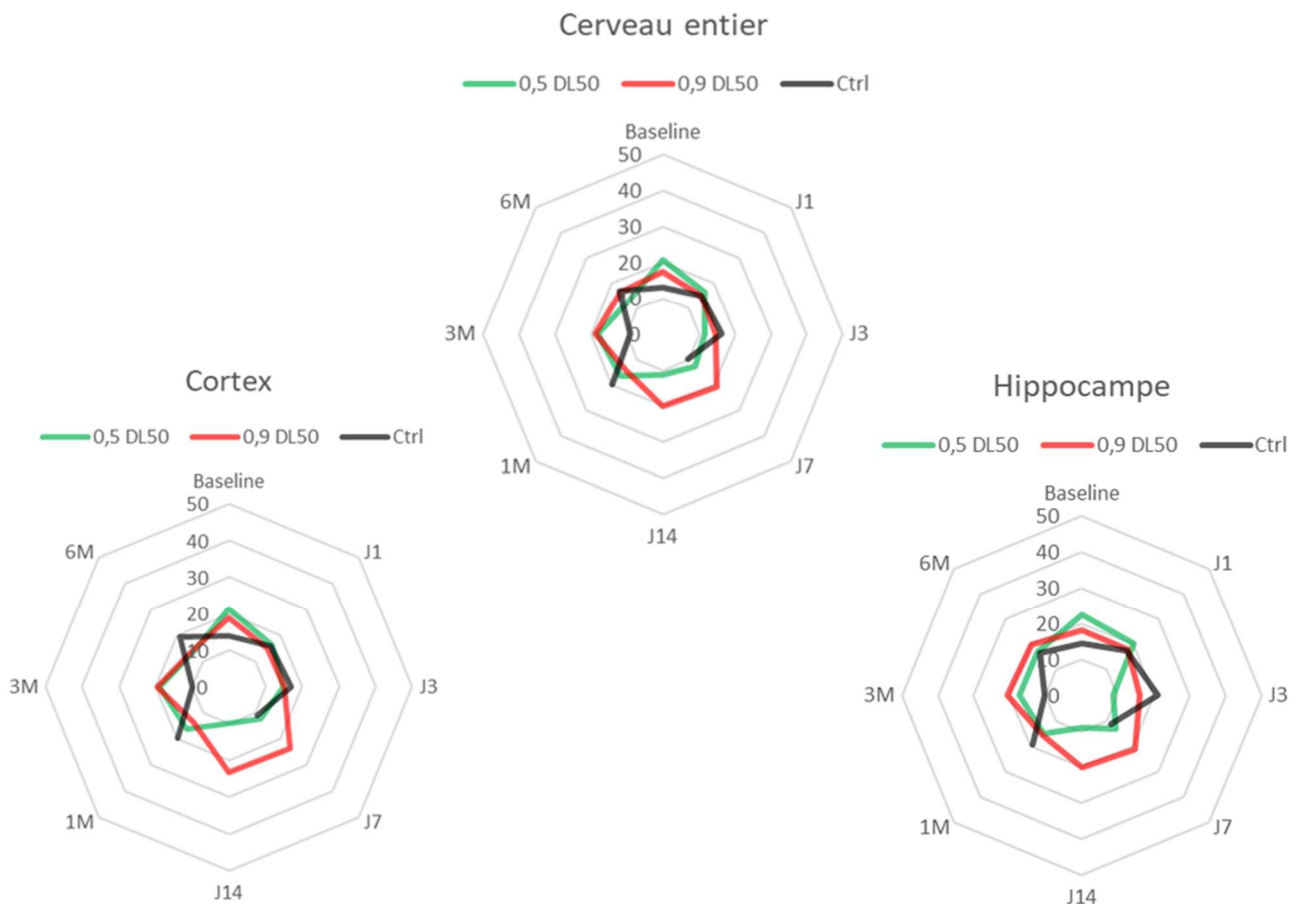


Figure 34: Coefficient de variation des AUC dans les différentes régions analysées et représenté pour chaque groupe et aux différents temps post-intoxication.

a. Suivi longitudinal avant traitement anti-inflammatoire

Les résultats de la fixation du radiotracer [¹⁸F]DPA-714 ont été exprimés en pourcentage de changement comparé à la baseline jusqu'à six mois post-intoxication. Une quantification sur le cerveau global a été effectuée, suite à une intoxication à une faible dose de NIMP (0.5 DL50) une augmentation significative de la fixation du radiotracer [¹⁸F]DPA-714 est observée à trois mois et à six mois post-exposition (p<0.05). Pour une forte dose de NIMP (0.9 DL50) une augmentation significative de la fixation du radiotracer est observée 6 mois post-intoxication (p<0.05) ainsi que dans les animaux contrôles (p<0.01) (Figure 35).

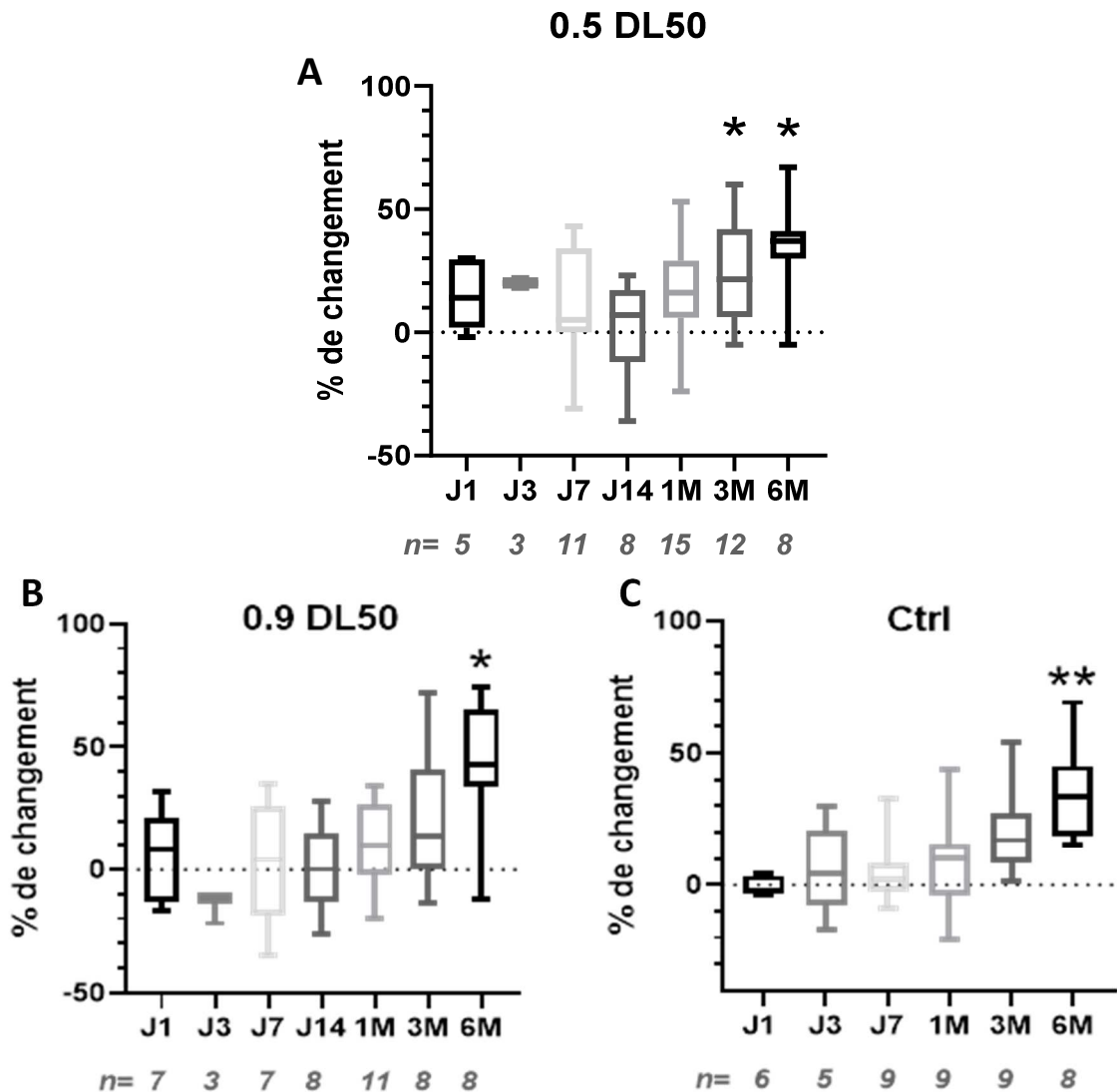


Figure 35: Fixation du [¹⁸F]DPA-714 sur cerveau entier au différents temps post-exposition dans les trois groupes d'intoxication : 0.5 DL50, 0.9 DL50 et contrôle (Ctrl).

Pourcentage de changement jusqu'à six mois post-intoxication comparé à la baseline dans les trois groupes d'intoxication 0.5 DL50 (A), 0.9 DL50 (B) et les souris contrôles (C). Significativité (p<0.05 * ; p<0.01 **).

La quantification de la fixation du [^{18}F]DPA-714 a été également analysée dans des zones cérébrales souvent touchées par les OPs. Au niveau du cortex, une fixation significativement plus importante apparaît dès un mois post-intoxication et se poursuit jusqu'à six mois dans le groupe 0.5 DL50 ($p < 0.05$). Dans le groupe de souris intoxiquées à 0.9 DL50 une différence significative est observée uniquement à 6 mois post-intoxication ($p < 0.05$). Pour les animaux contrôle on observe une augmentation de la fixation du radiotracer dès trois mois ($p < 0.05$) qui se retrouve également à 6 mois ($p < 0.01$) (**Figure 36**)

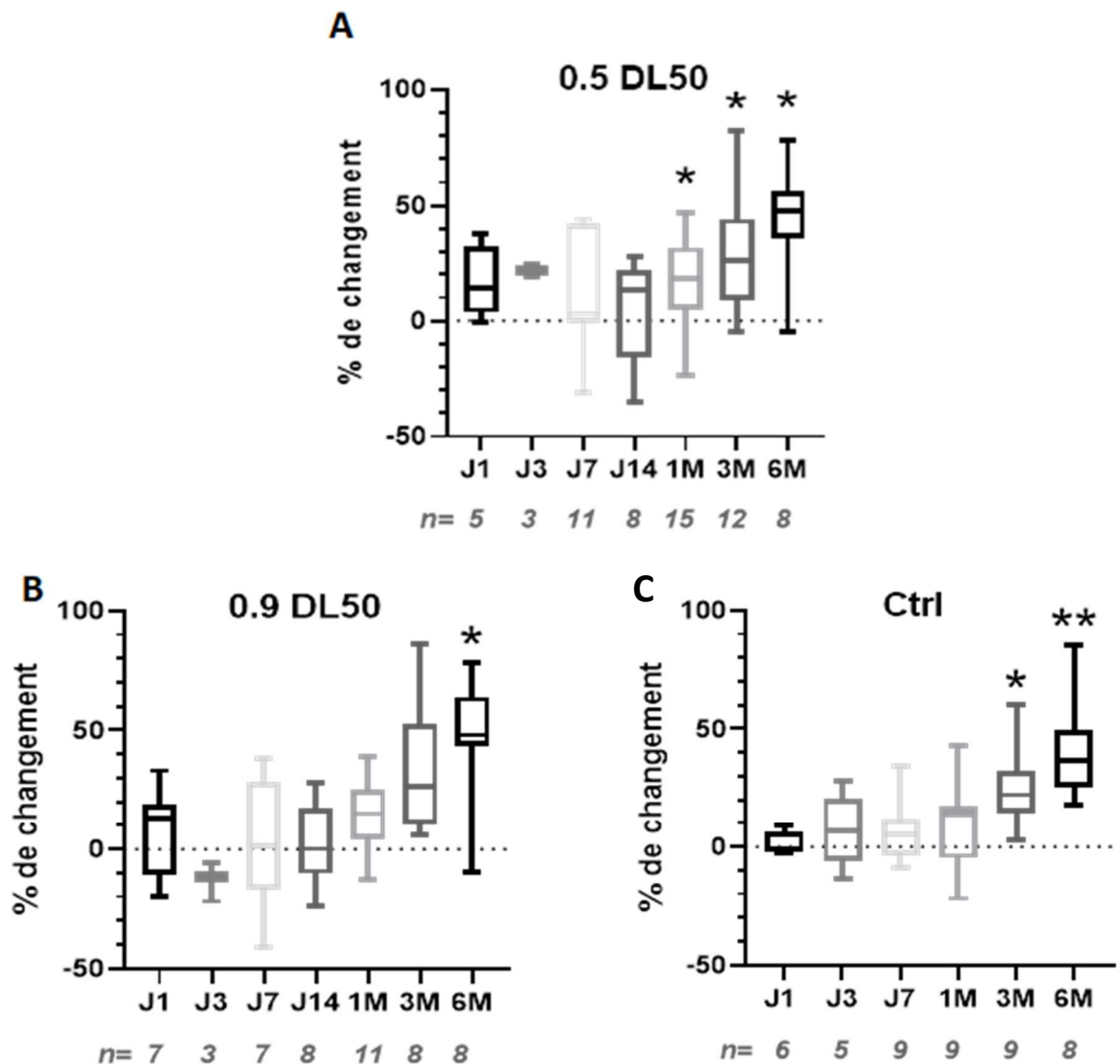


Figure 36: Fixation du [^{18}F]DPA-714 au niveau du cortex

Pourcentage de changement jusqu'à six mois post-intoxication comparé à la baseline dans les trois groupes d'intoxication 0.5 DL50 (A), 0.9 DL50 (B) et les souris contrôles (C). Significativité ($p < 0.05$ * ; $p < 0.01$ **).

Dans l'hippocampe, une des autres régions souvent impactées par les OPs, la fixation de ce radiotracer a été également investiguée. Le même profil d'augmentation significative qu'au niveau du cortex se retrouve dans le groupe de souris intoxiquées à faible dose, avec une augmentation dès le premier mois post-intoxication ($p < 0.05$). Cette augmentation se confirme jusqu'à six mois post-intoxication. Dans le groupe 0.9 DL50, une augmentation significative plus tardive dès trois mois post-intoxication est observée ($p < 0.05$) et se maintient également à six mois ($p < 0.05$). Le groupe contrôle quant à lui présente une augmentation significative de la fixation du radiotracer à six mois au niveau de l'hippocampe ($p < 0.01$) (Figure 37).

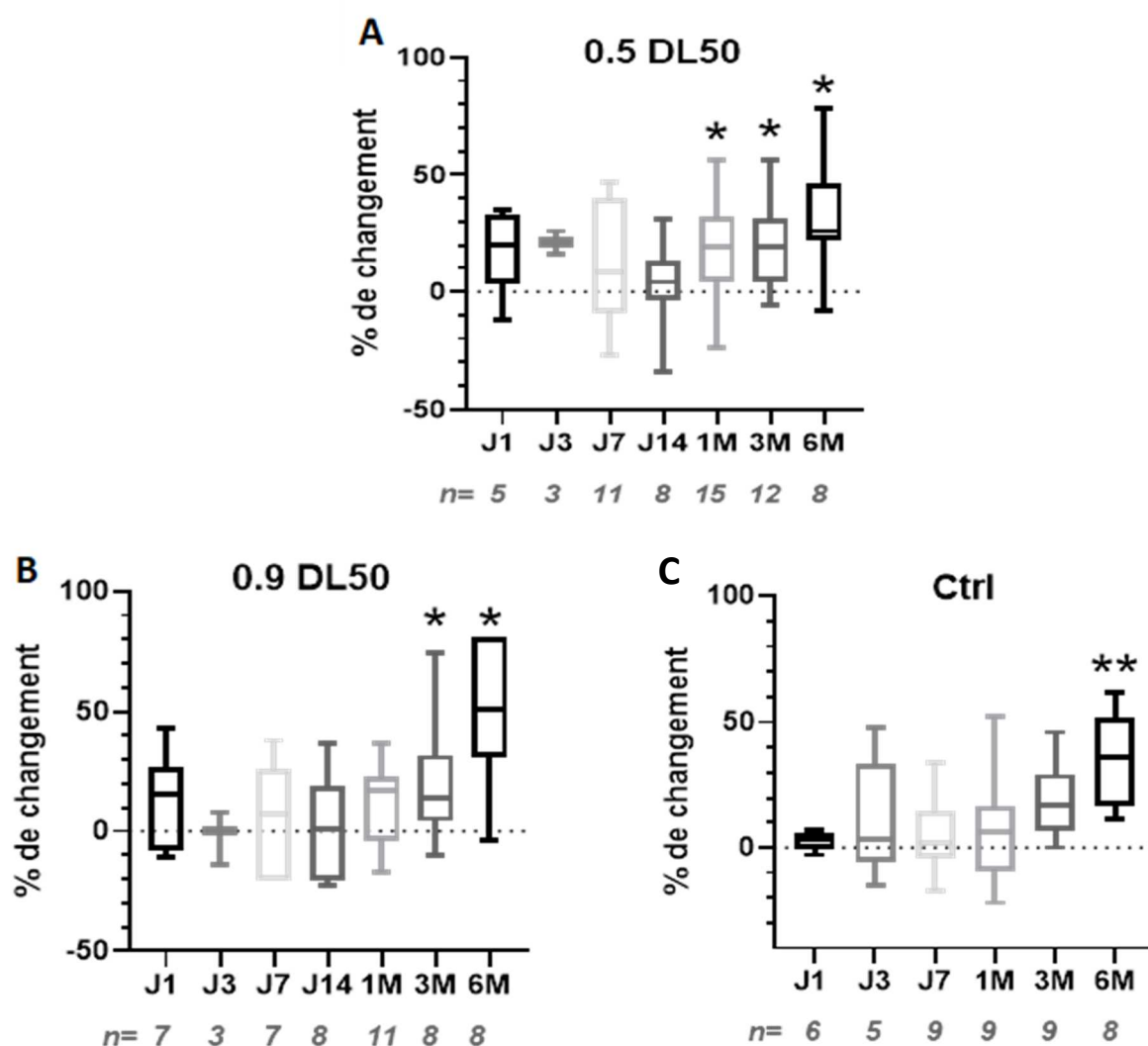


Figure 37: Fixation du [^{18}F]DPA-714 au niveau de l'hippocampe

Pourcentage de changement jusqu'à six mois post-intoxication comparé à la baseline dans les trois groupes d'intoxication 0.5 DL50 (A), 0.9 DL50 (B) et les souris contrôles (C). Significativité ($p < 0.05$ * ; $p < 0.01$ **).

b. Après traitement anti-inflammatoire

Un mois après intoxication à 0.5 DL50 une augmentation significative de la fixation du radiotracteur est observée au niveau du cortex pour les souris traitées avec la solution témoin (vehicule ne contenant pas de MK) ainsi que pour les souris traitées avec le MK (**Figure 38A**). Au niveau de l'hippocampe par contre, aucune augmentation significative n'a été observée après un traitement au MK un mois post-intoxication (**Figure 38B**) Etonnamment, une augmentation de la fixation du radiotracteur est retrouvée un mois post-injection de NaCl (intoxication contrôle) si les souris ont été traitées avec la solution témoin quelle que soit la zone cérébrale (cortex et hippocampe (**Figure 38B, D**)). Aucune différence significative n'a été trouvée un mois après quand les souris contrôles ont reçues un traitement au MK (**Figure 38B, D**).

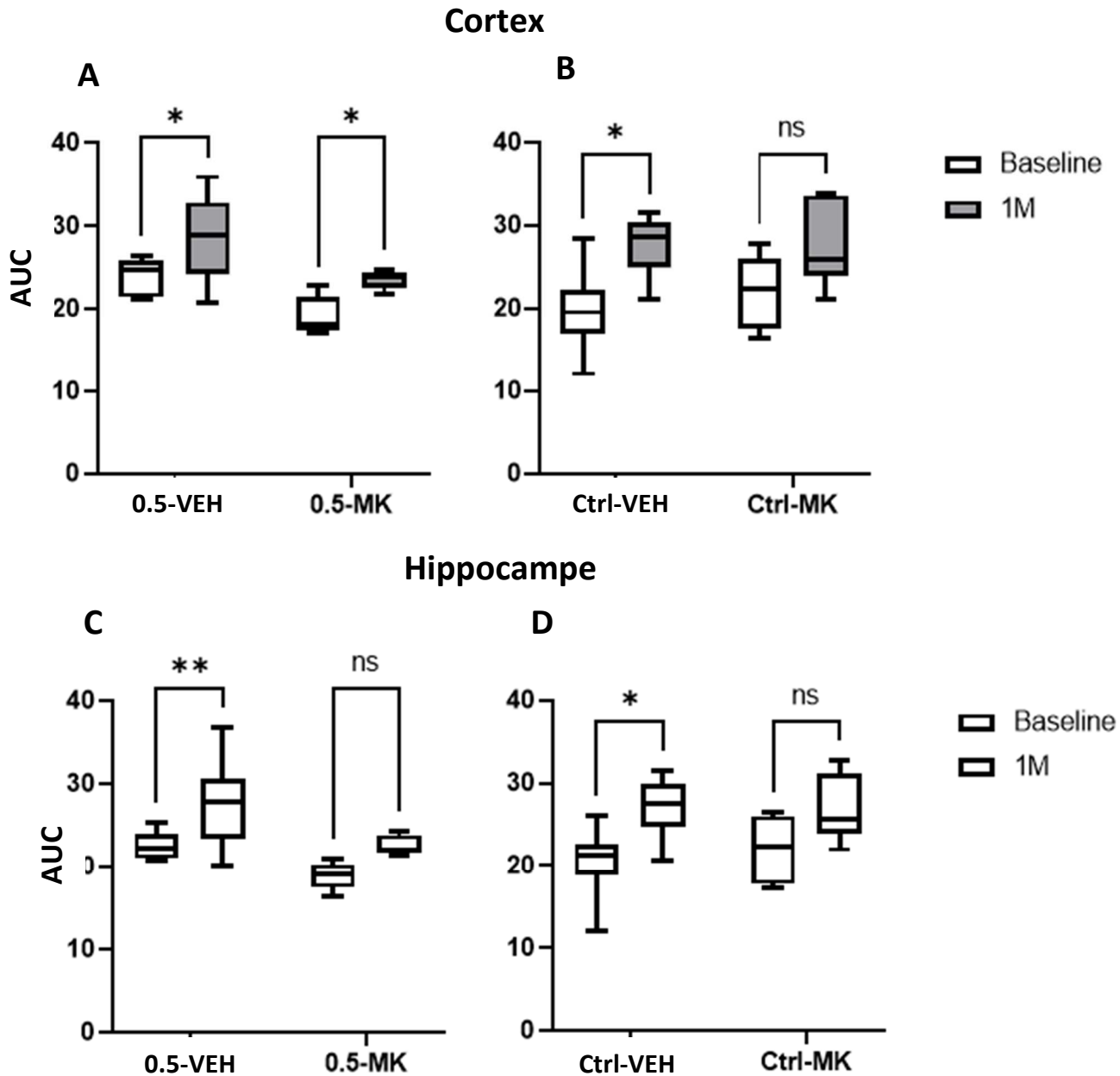


Figure 38: Fixation du [^{18}F]DPA-714 après traitement anti-inflammatoire.

Aires sous la courbe (AUC) des cinétiques (temps-activité) de la fixation du radiotracer [^{18}F]DPA-714 au niveau corticale chez des souris intoxiquées au NIMP à une dose de 0.5 DL50 non traitées (VEH) ou traitées (MK) (A). Fixation corticale du radiotracer chez des souris contrôles non traitées ou traitées avec un anti-inflammatoire (B). En (C) et (D) fixation cette fois-ci au niveau hippocampique. Significativité ($p < 0.05$ * ; $p < 0.01$ **).

III. Analyse histologique

Afin de valider les données TEP et d'investiguer l'origine cellulaire de l'expression TSPO des analyses immunofluorescentes ont été réalisées sur coupes de cerveau de souris intoxiquées.

Visuellement, un marquage plus important microglial (marquage CD11b) est observé sur des coupes cérébrales acquises en panorama dans le groupe à faible dose un mois post-intoxication comparé aux groupes 0.9 DL50 et contrôle (**Figure 39A**). Une vue magnifiée au niveau de l'hippocampe a permis de mettre en évidence que TSPO (vert) est colocalisée avec les microglies (orange) et non pas avec les astrocytes (rouge).

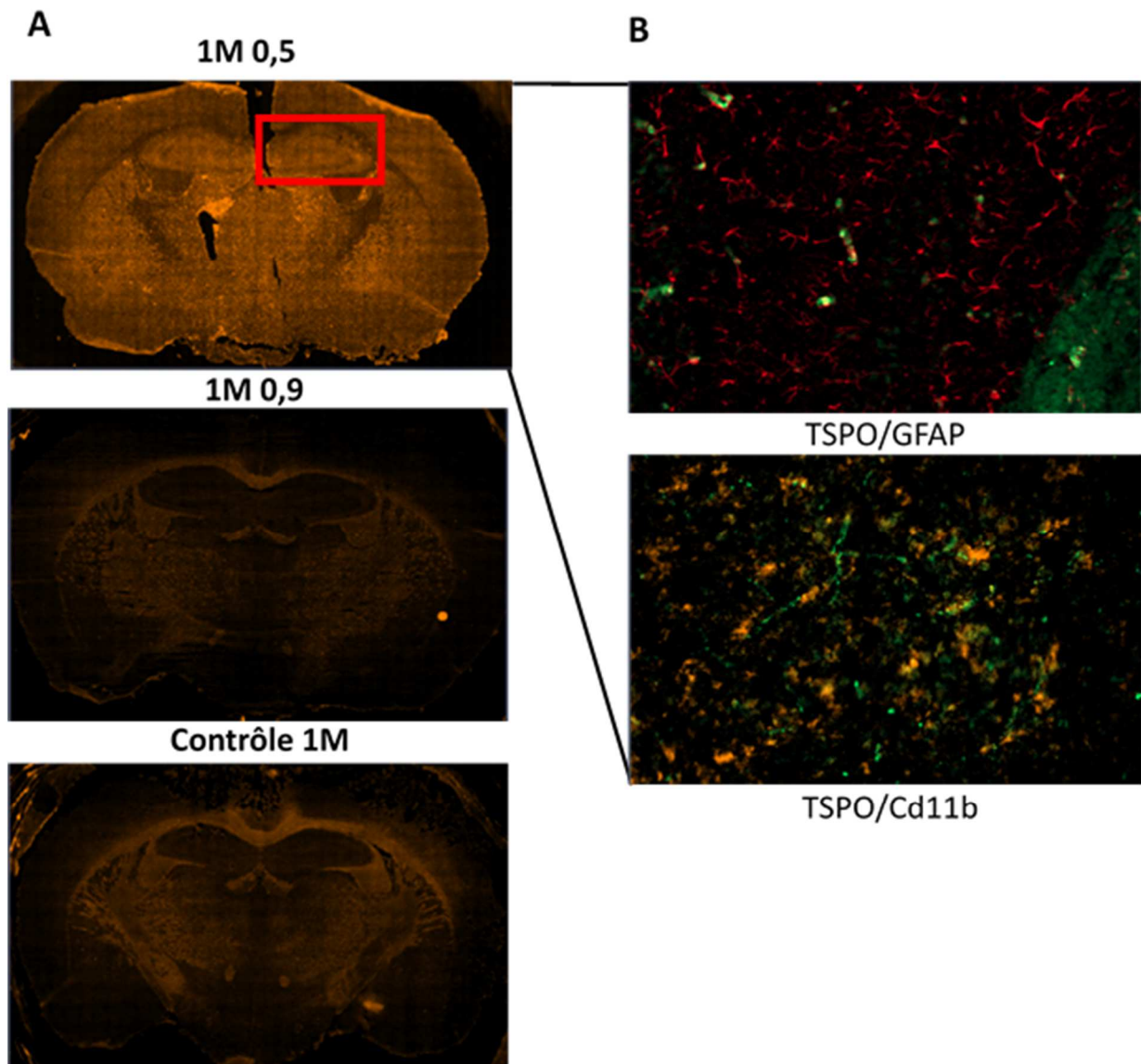


Figure 39: Immunofluorescence sur coupes cérébrales murines.

Coupes cérébrales représentatives du marquage CD11b (anticorps primaire AbIN284101) à un mois post-intoxication selon les groupes (0.5 DL50 ; 0.9 DL50 et Ctrl) (A). Double marquage fluorescent utilisant les anticorps primaires dirigés contre TSPO (EPR5384) ; cd11b (AbIN284101) et/ou GFAP (AB4674). Les anticorps secondaires AF488 goat anti-rabbit (vert) ; AF-546 goat anti-rat (orange) et AF647 goat anti-chicken (rouge) ont été utilisés pour révéler la présence des cibles des anticorps primaires TSPO, CD11b et GFAP respectivement.

DISCUSSION

Cette étude a permis d'investiguer pour la première fois l'évolution de la neuroinflammation *in vivo* en utilisant l'imagerie TEP TSPO jusqu'à six mois post-intoxication utilisant d'un OP, le NIMP à des doses sous létales.

Les OPs sont les composés chimiques les plus toxiques jamais synthétisés. Ils présentent des risques importants et seulement certains laboratoires sont autorisés à les utiliser, notamment dans des conditions de sécurité renforcée. Pour étudier leurs impacts et tester des stratégies thérapeutiques certains analogues moins toxiques ont été synthétisés. Dans notre étude nous avons utilisé le NIMP comme agent neurotoxique au vu de ses plus grandes similarités avec le sarin comparativement au DFP. En effet, le DFP, un insecticide, est largement utilisé dans les recherches sur les OPs car il présente des similarités structurales et chimiques avec le sarin. Il est cependant moins toxique étant donné qu'il ne phosphoryle pas l'AChE avec le même fragment que le sarin (91). En 2012, une équipe a travaillé sur le développement de nouveaux analogues plus proches du sarin. Ces analogues sont capables de phosphoryler l'AChE de la même manière que l'agent neurotoxique. Leur efficacité à inhiber les AChE a été testée sur des tissus de rats et en *in vivo* chez cette même espèce. L'utilisation de doses sous létales de NIMP a provoqué l'inhibition de 80% des AChE cérébrales avec une inhibition maximale retrouvée à une heure post-exposition (89). Une étude cinétique d'inhibition des AChE, a montré que le NIMP inhibe plus rapidement les enzymes dans des homogénats de cerveaux rongeurs (rats/souris) que l'insecticide DFP. Le modèle murin intoxiqué au NIMP a montré qu'à des doses sous létales dès 0.5 DL50, les activités des AChE hippocampiques étaient fortement inhibées à 6h et 24h post-intoxication et qu'une activité normale des AChE était retrouvée seulement à un mois post-exposition au NIMP (42). Cette nouvelle génération de substituts non volatiles utilisables en laboratoire « classique » est prometteuse car ces composés ont des capacités inhibitrices proches des agents neurotoxiques et sont plus stables en solution que le DFP favorisant une utilisation sécuritaire en laboratoire (92).

Dans notre étude, le NIMP a été utilisé en sous cutanée à des doses sous létales (0.5 DL50 et 0.9 DL50). Dans la majorité des études utilisant des modèles d'intoxication aux OPs avec l'installation d'un statut épileptique de l'atropine est utilisé avant l'injection du neurotoxique pour permettre d'augmenter le taux de survie des animaux (93). Aux doses sous létales utilisées dans notre étude aucun prétraitement n'est requis ce qui permet d'étudier l'effet spécifique du toxique seul sur la neuroinflammation. Nos résultats montrent l'apparition de divers symptômes caractéristiques d'une intoxication aux OPs suite à l'inhibition des AChE par le NIMP. Ces

observations sur le court terme ont permis de valider les signes d'une intoxication cholinergique précédemment décrite dans ce premier modèle murin intoxiqué par le NIMP (42).

Les conséquences d'une exposition répétée à de faibles doses de neurotoxique sur les fonctions cérébrales ont été investiguées. Un modèle rat exposé durant cinq jours à de faibles doses de DFP a été utilisé pour performer une batterie de tests comportementaux. Les rats ont montré des signes de dépression, d'anxiété et des troubles mnésiques trois mois après intoxication par le DFP (94). Une exposition répétée à de faibles doses de sarin chez les cochons d'Inde a également montré des troubles neurocomportementaux notamment une altération de la démarche, des rythmes du sommeil altérés et des difficultés d'adaptation (95). Très peu d'études se sont intéressées aux conséquences neurologiques tardives suite à une exposition unique à des doses sous létales. Dans le modèle murin NIMP, une perturbation des capacités mnésiques à court terme a été observée un mois post-intoxication que ce soit dans le groupe à faible et à forte doses. En effet, les performances exploratoires suite au test de reconnaissance d'objets ont été altérées (42).

Ces résultats démontrent l'importance d'un diagnostic précoce des victimes exposées que ce soit à de fortes ou de faibles doses de neurotoxique et suggèrent le développement de thérapies innovantes empêchant l'installation de troubles cognitifs sur le long terme.

De plus, diverses études ont montré l'implication de la neuroinflammation retrouvée lors d'un statut épileptique dans la mise en place de troubles neurologiques (62). Bien qu'il n'y ait pas encore de démonstration du lien direct entre la neuroinflammation et l'apparition de troubles cognitifs suite à l'exposition d'un neurotoxique les études sur l'épilepsie montrant une synergie néfaste de la neuroinflammation nous suggèrent que notre modèle peut subir les mêmes effets (61). De plus, des traitements diminuant l'inflammation suite à une exposition à des OPs ont montré des effets bénéfiques sur le comportement (96).

L'imagerie TEP TSPO *in vivo* est utilisée pour accéder aux processus inflammatoires qui sont mis en place dans diverses pathologies. Notre étude longitudinale sur 6 mois est la première effectuée dans un modèle murin d'intoxication à des doses sous létales de neurotoxique. Nos résultats suggèrent que la réponse inflammatoire faisant suite à une intoxication à un OP est très dynamique. La première phase a consisté à suivre l'évolution de la neuroinflammation pour déterminer une fenêtre thérapeutique d'action. Nos résultats ont montré qu'une augmentation de la fixation du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ au niveau cortical et hippocampique était détectable un mois après intoxication chez le groupe de souris intoxiquées à faible dose. Or aucune augmentation n'a été observée dans le groupe à forte dose à un mois dans ces mêmes régions

cérébrales. Une augmentation plus tardive à trois mois a été observée dans l'hippocampe de ce groupe d'animaux. Au regard des régions cérébrales étudiées, la dynamique de la réponse inflammatoire n'est pas la même suivant les groupes d'intoxication. Les différences observées *in vivo* dans la fixation du radiotracer montrent bien que le profil inflammatoire suivant une intoxication à un OP est dépendante de la région cérébrale, dont certaines sont plus sensibles aux OPs que d'autres. De plus, dans les groupes témoins une augmentation du radiotracer est également visible essentiellement à six mois. Ces résultats suggèrent que le vieillissement est probablement impliqué dans l'augmentation de la fixation du [¹⁸F]DPA-714 à des temps tardifs. De plus, l'utilisation du NIMP plutôt que le DFP dans le modèle murin établi par nos collaborateurs à l'IRBA rend nos résultats plus pertinents pour le suivi de la neuroinflammation en cas de comparaison au neurotoxique initial le sarin. Le DFP et le NIMP sont tous les deux analogues du sarin mais le NIMP présente une mécanistique plus proche des agents neurotoxiques. En effet, une étude a montré que suivant le toxique utilisé sur un même modèle animal la réponse inflammatoire était différente. Une neuroinflammation et une gliose plus importante ont été observées après une intoxication au DFP comparativement au soman (97).

A ce jour, deux études précliniques en TEP ont utilisé des radiotraceurs ciblant TSPO le (R)-[¹¹C]PK11195 et le [¹⁸F]PBR111 respectivement, pour évaluer la neuroinflammation dans des modèles rats intoxiqués à des doses létales de DFP (62,63). La première étude a utilisé un radiotracer TSPO de 1ère génération alors que la deuxième a utilisé un de seconde génération. Dans notre étude, l'utilisation du radiotracer [¹⁸F]DPA-714 de seconde génération a été envisagée pour pallier les inconvénients que présente le (R)-[¹¹C]PK11195. En effet, ce radiotracer a une fixation non spécifique assez importante résultant d'un ratio signal sur bruit assez faible (98). Les deux études précédentes ont utilisé la même espèce animale (rat), la même molécule (DFP) mais des techniques d'administration du neurotoxique différentes. Flannery et ses collaborateurs ont utilisé une injection intrapéritonéale de DFP à 9mg/kg alors qu'Hobson et ses collaborateurs ont utilisé une injection sous cutanée à 4mg/kg. Quel que soit le protocole les rats ont développé rapidement un état de mal épileptique. Chez les rats présentant des crises épileptiques de stade modéré à sévère, une augmentation significative de la fixation du radiotracer (R)-[¹¹C]PK11195 a été observée jusqu'à 21 jours post-intoxication (62). L'utilisation du [¹⁸F]PBR111 dans un modèle d'intoxication similaire a montré également une augmentation de la fixation de ce radiotracer jusqu'à 28 jours post-intoxication (63). Ce qui est important de préciser, c'est que ces modèles d'épilepsie induite par des OPs présentent une forte réponse inflammatoire qui est associée à la sévérité des crises et pas seulement à l'action directe du toxique. Une étude en imagerie TEP sur un modèle de rat épileptique non induite par des OPs a montré que la surexpression de TSPO était

associée dans un premier temps à l'épileptogénèse au début de la maladie, puis elle était liée plus tardivement à la fréquence des crises au cours de l'épilepsie chronique (99). Dans notre modèle murin, les doses sous létales ne provoquent pas de crises épileptiques pourtant une augmentation de la neuroinflammation est observée à 1 mois post-intoxication dans le groupe à faible dose et plus tardivement chez la forte dose. L'imagerie TEP utilisant le [¹⁸F]DPA-714 peut donc être utilisée pour détecter une inflammation non focale induite par de faibles doses d'OPs. En effet, les radiotraceurs TSPO de seconde génération ont beaucoup été utilisés dans des modèles d'inflammation cérébrale focalisée et avec une élévation importante de la neuroinflammation (AVC, épilepsie...). Dans notre étude d'inflammation cérébrale (non focalisée) générée par une injection sous cutanée de NIMP, le [¹⁸F]DPA-714 est capable de monitorer l'évolution de la neuroinflammation. Les performances du [¹⁸F]DPA-714 n'avaient pas fait leurs preuves dans un modèle d'intoxication modérée utilisant le lipopolysaccharide (LPS) (100). Néanmoins, pour la première fois nous avons investigué la fixation d'un traceur TSPO au-delà du premier mois post-intoxication. Les résultats obtenus avec le [¹⁸F]DPA-714 suggèrent que l'augmentation de l'inflammation observée à six mois pourrait être dû au vieillissement cérébral. Une augmentation en lien avec l'âge a déjà été observée avec le radiotraceur TSPO [¹¹C]PBR28 chez le rat (101). Ce qui semble être en concordance avec une étude clinique qui a montré que la fixation d'un radiotraceur [¹¹C]PBR28 ciblant TSPO était influencée par divers facteurs dont l'âge, l'indice de masse corporelle et le sexe. En effet, sa fixation a été corrélée positivement à l'âge des participants (102).

L'utilisation des valeurs SUV est très répandue en imagerie TEP que ce soit en clinique ou préclinique (103). Nous avons décidé d'utiliser cette métrique car suite aux effets de l'intoxication et à l'étude longitudinale les variations de poids étaient non négligeables chez les animaux (poids de départ entre 35 et 40g, poids six mois : 55-60g). De plus, étant donné que la cible TSPO présente des sites de fixations en périphérie, la distribution du radiotraceur peut être influencée avec la croissance tissulaire (104). Une région de référence présentant pas ou très peu de protéines cibles est souvent utilisée pour permettre de normaliser les données. Dans l'étude TEP d'un modèle d'intoxication au DFP chez le rat, les chercheurs ont proposé l'utilisation du cervelet comme région de référence car aucune différence histologique n'avait été observée entre les groupes et les différents temps post-intoxication pour la protéine TSPO (63). Nos données en imagerie *in vivo* ont montré une augmentation significative du signal même au niveau du cervelet à des temps tardifs (données non affichées). Pour accéder à la variabilité de nos données SUV, des coefficients de variation ont été calculés. Quel que soit le temps post-exposition du neurotoxique dans chaque groupe le CV des AUC calculées à partir des cinétiques cérébrales en SUV ne dépassait pas 20%. Ces résultats montrent la robustesse et la reproductibilité de notre approche d'imagerie TEP.

L'imagerie TEP TSPO n'est pas spécifique d'un seul type cellulaire. Nous avons effectué des triples marquages afin d'identifier l'origine cellulaire d'expression TSPO à un mois post-intoxication. L'augmentation du signal TSPO *in vivo* observée dans notre modèle coïncide avec une activation microgliale et non astrocytaire. Lors de l'instauration d'un état de mal épileptique une activation à la fois microgliale et astrocytaire est observée avec un pic à sept jours suite à une injection de DFP et persiste jusqu'à 21 jours post-intoxication (62). Dans un modèle similaire chez le rat, Hobson et ses collaborateurs ont également mis en évidence que l'augmentation du signal TSPO *in vivo* de J3 à J28 était corrélé à la fois aux microglies et aux astrocytes (63). Dans le modèle murin utilisé dans notre étude, seules les microglies ont été identifiées comme participant au signal TEP TSPO obtenu *in vivo* à un mois post-intoxication. Notre étude est la troisième à proposer une correspondance histologique avec le signal TEP dans des modèles d'intoxication aux OPs. Par contre, les différences observées entre les études en histologie sur l'activation gliale contribuant au signal TEP sont certainement dû à la dose et à la nature du toxique utilisé. Nos données sont validées par l'étude préalablement menée par nos collaborateurs (42). D'autres quantifications seraient envisageables pour déterminer la participation des divers types cellulaires au signal TEP à des temps plus tardifs comme trois mois et six mois. Notre étude histologique a permis d'identifier un des types cellulaires à cibler lors d'une intoxication à des OPs pour appliquer des thérapies.

L'imagerie TSPO nous a permis d'identifier une fenêtre thérapeutique d'action avant le premier mois post-intoxication. Elle est aussi très utile pour suivre la réponse à des thérapies anti-inflammatoires. Cette stratégie a été utilisée dans deux modèles épileptiques (rat et souris) suite à un traitement faisant intervenir la minocycline qui est connue pour inhiber l'activation microgliale mais aussi pour avoir des effets anti-inflammatoires directs ou indirects sur d'autres types cellulaires comme les astrocytes. Une de ces deux études a permis de souligner les effets doses du traitement sur l'atténuation du signal TEP TSPO *in vivo* (105). La majorité des études proposant des thérapies anti-inflammatoires suite à une intoxication à des OPs a été effectuée sur des modèles présentant un état de mal épileptique (74). Notre étude montre que suite à une intoxication à faible dose et l'utilisation de la solution vehicle (NaCl/EtOH) pour le traitement, une augmentation significative du signal TEP à un mois post-intoxication est observée comme nous l'avons constaté en phase 1 au niveau du cortex et de l'hippocampe. Par contre, le traitement avec le MK a atténué le signal TEP hippocampique à un mois post-traitement et donc, aucune différence significative n'a été observée comparé à la baseline. Le MK antagoniste des récepteurs CysLT1 va empêcher ainsi la fixation des leucotriènes sur ces derniers, et va inhiber leurs action pro-inflammatoire dans l'organisme (81). Cependant, une augmentation significative du signal TEP

cortical est encore retrouvée chez les souris intoxiquées malgré le traitement MK. Ces observations suggèrent que l'effet du MK serait différent selon les zones cérébrales. Inopinément, nous avons constaté une augmentation significative du signal TEP un mois après traitement comparé à la baseline chez les souris contrôles (injection de NaCl en sous cutanée au lieu du NIMP) et traitées à la solution vehicule. Un traitement MK chez ces animaux témoins ne montre plus de différence significative entre la fixation du [¹⁸F]DPA-714 à un mois comparé à la baseline. La validation de ces résultats *in vivo* par analyse immunofluorescente est en cours. Une hypothèse qui expliquerait ce résultat inattendu serait que l'administration répétée d'éthanol présente dans la solution de gavage participerait à une élévation du signal TEP TSPO. En effet, une augmentation de la fixation du [¹⁸F]DPA-714 a été montrée suite à une exposition à l'alcool chez des babouins (106) ainsi que des rats adolescents (107). Cette deuxième phase a permis de mettre en évidence l'utilité de l'imagerie TEP TSPO pour suivre *in vivo* une thérapie anti-inflammatoire dans un modèle d'intoxication à un OP.

Cette étude a permis de suivre *in vivo*, grâce à l'imagerie TEP au [¹⁸F]DPA-714, la mise en place de processus neuro-inflammatoires suite à une intoxication à des doses sous létales de NIMP.

RÉFÉRENCES

1. Minton NA, Murray VS. A review of organophosphate poisoning. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.* oct 1988;3(5):350-75.
2. Jaga K, Dharmani C. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. *Rev Environ Health.* mars 2007;22(1):57-73.
3. Dharmani C, Jaga K. Epidemiology of acute organophosphate poisoning in hospital emergency room patients. *Rev Environ Health.* sept 2005;20(3):215-32.
4. Thredgold L, Gaskin S, Quy C, Pisaniello D. Exposure of Agriculture Workers to Pesticides: The Effect of Heat on Protective Glove Performance and Skin Exposure to Dichlorvos. *Int J Environ Res Public Health.* 29 nov 2019;16(23):E4798.
5. Nielsen JB. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Arch Dermatol Res.* juin 2005;296(12):560-7.
6. Boudry I, Blanck O, Cruz C, Blanck M, Vallet V, Bazire A, et al. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models in vitro and human skin grafted onto nude mouse skin model in vivo. *J Appl Toxicol JAT.* juill 2008;28(5):645-57.
7. Miller MA, Kasting GB. Toward a better understanding of pesticide dermal absorption: diffusion model analysis of parathion absorption in vitro and in vivo. *J Toxicol Environ Health A.* 2010;73(4):284-300.
8. Moore CA, Wilkinson SC, Blain PG, Dunn M, Aust GA, Williams FM. Percutaneous absorption and distribution of organophosphates (chlorpyrifos and dichlorvos) following dermal exposure and decontamination scenarios using in vitro human skin model. *Toxicol Lett.* 17 août 2014;229(1):66-72.
9. Sudakin DL, Stone DL. Dialkyl phosphates as biomarkers of organophosphates: the current divide between epidemiology and clinical toxicology. *Clin Toxicol Phila Pa.* nov 2011;49(9):771-81.
10. Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, et al. Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci Total Environ.* 1 oct 2004;332(1-3):71-80.
11. Paudyal BP. Organophosphorus poisoning. *JNMA J Nepal Med Assoc.* déc 2008;47(172):251-8.
12. Bajracharya SR, Prasad PN, Ghimire R. Management of Organophosphorus Poisoning. *J Nepal Health Res Counc.* sept 2016;14(34):131-8.
13. Abou-Donia MB, Siracuse B, Gupta N, Sobel Sokol A. Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Crit Rev Toxicol.* 25 nov 2016;46(10):845-75.
14. Testud F, Grillet J-P. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoïdes de synthèse et divers. *EMC - Pathol Prof Environ.* 1 janv 2007;2:1-24.
15. Grauer E, Chapman S, Rabinovitz I, Raveh L, Weissman B-A, Kadar T, et al. Single whole-body exposure to sarin vapor in rats: Long-term neuronal and behavioral deficits. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 mars 2008;227(2):265-74.
16. Schultz MK, Wright LKM, de Araujo Furtado M, Stone MF, Moffett MC, Kelley NR, et al. Caramiphen edisylate as adjunct to standard therapy attenuates soman-induced seizures and cognitive deficits in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1 juill 2014;44:89-104.

17. Mackenzie Ross SJ, Brewin CR, Curran HV, Furlong CE, Abraham-Smith KM, Harrison V. Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. *Neurotoxicol Teratol.* août 2010;32(4):452-9.
18. Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, Calderon N, et al. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect.* août 2011;119(8):1189-95.
19. Yolton K, Xu Y, Sucharew H, Succop P, Altaye M, Popelar A, et al. Impact of low-level gestational exposure to organophosphate pesticides on neurobehavior in early infancy: a prospective study. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 13 sept 2013;12(1):79.
20. Jeffrey MG, Krengel M, Kibler JL, Zundel C, Klimas NG, Sullivan K, et al. Neuropsychological Findings in Gulf War Illness: A Review. *Front Psychol.* 26 sept 2019;10:2088.
21. White RF, Steele L, O'Callaghan JP, Sullivan K, Binns JH, Golomb BA, et al. Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav.* janv 2016;74:449-75.
22. Kerr KJ. Gulf War illness: an overview of events, most prevalent health outcomes, exposures, and clues as to pathogenesis. *Rev Environ Health.* 2015;30(4):273-86.
23. Campdelacreu J. Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurol Barc Spain.* déc 2014;29(9):541-9.
24. Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JCS, et al. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology.* 11 mai 2010;74(19):1524-30.
25. Brouwer M, Huss A, van der Mark M, Nijssen PCG, Mulleners WM, Sas AMG, et al. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ Int.* oct 2017;107:100-10.
26. McGuire V, Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, et al. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 15 juin 1997;145(12):1076-88.
27. Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46(3):284-7.
28. McDonough JH, Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* sept 1997;21(5):559-79.
29. McCarren HS, Eisen MR, Nguyen DL, Dubée PB, Ardinger CE, Dunn EN, et al. Characterization and treatment of spontaneous recurrent seizures following nerve agent-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res.* mai 2020;162:106320.
30. Deshpande LS, DeLorenzo RJ. Novel therapeutics for treating organophosphate-induced status epilepticus co-morbidities, based on changes in calcium homeostasis. *Neurobiol Dis.* janv 2020;133:104418.
31. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* avr 2005;46(4):470-2.
32. Pitkänen A, Ekolle Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers - Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis.* mars 2019;123:42-58.
33. Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.* 5 sept 2013;14(9):18284-318.

34. Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T. Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. *J Neurol Sci.* 1 nov 2006;249(1):76-85.
35. Naughton SX, Terry AV. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology.* 1 sept 2018;408:101-12.
36. Valli H. Effects of sarin on the nervous system in rescue team staff members and police officers 3 years after the Tokyo subway sarin attack. *Environ Health Perspect.* 2001;109(11):5.
37. Proctor SP, Heaton KJ, Heeren T, White RF. Effects of sarin and cyclosarin exposure during the 1991 Gulf War on neurobehavioral functioning in US army veterans. *NeuroToxicology.* 1 déc 2006;27(6):931-9.
38. Levin HS, Rodnitzky RL, Mick DL. Anxiety Associated With Exposure to Organophosphate Compounds. *Arch Gen Psychiatry.* 1 févr 1976;33(2):225-8.
39. Behan PO. Chronic Fatigue Syndrome as a Delayed Reaction to Chronic Low-dose Organophosphate Exposure. *J Nutr Environ Med.* 1 janv 1996;6(4):341-50.
40. Baille V, Dorandeu F, Carpentier P, Bizot J-C, Filliat P, Four E, et al. Acute exposure to a low or mild dose of soman: Biochemical, behavioral and histopathological effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 8 juill 2001;69(3):561-9.
41. Guignet M, Dhakal K, Flannery BM, Hobson BA, Zolkowska D, Dhir A, et al. Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication. *Neurobiol Dis.* janv 2020;133:104431.
42. Angrand L, Takillah S, Malissin I, Berriche A, Cervera C, Bel R, et al. Persistent brainwave disruption and cognitive impairment induced by acute sarin surrogate sub-lethal dose exposure. *Toxicology.* 30 mai 2021;456:152787.
43. Mesraoua B, Deleu D, Al Hail H, Melikyan G, Boon P, Haider HA, et al. Electroencephalography in epilepsy: look for what could be beyond the visual inspection. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* nov 2019;40(11):2287-91.
44. Murata K, Araki S, Yokoyama K, Okumura T, Ishimatsu S, Takasu N, et al. Asymptomatic sequelae to acute sarin poisoning in the central and autonomic nervous system 6 months after the Tokyo subway attack. *J Neurol.* 1 oct 1997;244(10):601-6.
45. van Helden HPM, Vanwersch RAP, Kuijpers WC, Trap HC, Philippens IHC, Benschop HP. Low levels of sarin affect the eeg in marmoset monkeys: a pilot study. *J Appl Toxicol.* 2004;24(6):475-83.
46. Crouzier D, Le Crom VB, Four E, Lallement G, Testylier G. Disruption of mice sleep stages induced by low doses of organophosphorus compound soman. *Toxicology.* 1 juin 2004;199(1):59-71.
47. Chao LL, Abadjian L, Hlavin J, Meyerhoff DJ, Weiner MW. Effects of low-level sarin and cyclosarin exposure and Gulf War Illness on Brain Structure and Function: A study at 4T. *NeuroToxicology.* 1 déc 2011;32(6):814-22.
48. Chao LL, Zhang Y, Buckley S. Effects of low-level sarin and cyclosarin exposure on white matter integrity in Gulf War Veterans. *NeuroToxicology.* 1 mai 2015;48:239-48.
49. Yamasue H, Abe O, Kasai K, Suga M, Iwanami A, Yamada H, et al. Human brain structural change related to acute single exposure to sarin. *Ann Neurol.* janv 2007;61(1):37-46.
50. Filippi M, Agosta F. Diffusion tensor imaging and functional MRI. *Handb Clin Neurol.* 2016;136:1065-87.
51. Chao LL, Zhang Y. Effects of low-level sarin and cyclosarin exposure on hippocampal microstructure in Gulf War Veterans. *Neurotoxicol Teratol.* août 2018;68:36-46.

52. Heaton KJ, Palumbo CL, Proctor SP, Killiany RJ, Yurgelun-Todd DA, White RF. Quantitative magnetic resonance brain imaging in US army veterans of the 1991 Gulf War potentially exposed to sarin and cyclosarin. *Neurotoxicology*. juill 2007;28(4):761-9.
53. Hobson BA, Rowland DJ, Supasai S, Harvey DJ, Lein PJ, Garbow JR. A magnetic resonance imaging study of early brain injury in a rat model of acute DFP intoxication. *Neurotoxicology*. mai 2018;66:170-8.
54. Banks CN, Lein PJ. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology*. juin 2012;33(3):575-84.
55. Duysen EG, Li B, Xie W, Schopfer LM, Anderson RS, Broomfield CA, et al. Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *J Pharmacol Exp Ther*. nov 2001;299(2):528-35.
56. Rohlman DS, Anger WK, Lein PJ. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology*. mars 2011;32(2):268-76.
57. Collombet J-M, Four E, Bernabé D, Masqueliez C, Burckhart M-F, Baille V, et al. Soman poisoning increases neural progenitor proliferation and induces long-term glial activation in mouse brain. *Toxicology*. 30 mars 2005;208(3):319-34.
58. Sisó S, Hobson BA, Harvey DJ, Bruun DA, Rowland DJ, Garbow JR, et al. Editor's Highlight: Spatiotemporal Progression and Remission of Lesions in the Rat Brain Following Acute Intoxication With Diisopropylfluorophosphate. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 1 juin 2017;157(2):330-41.
59. Lazar S, Egoz I, Brandeis R, Chapman S, Bloch-Shilderman E, Grauer E. Propagation of damage in the rat brain following sarin exposure: Differential progression of early processes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 nov 2016;310:87-97.
60. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. août 2019;15(8):459-72.
61. Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T, et al. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 25 févr 2015;35(8):3330-45.
62. Flannery BM, Bruun DA, Rowland DJ, Banks CN, Austin AT, Kukis DL, et al. Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J Neuroinflammation*. 12 oct 2016;13(1):267.
63. Hobson BA, Rowland DJ, Sisó S, Guignet MA, Harmany ZT, Bandara SB, et al. TSPO PET Using [18F]PBR111 Reveals Persistent Neuroinflammation Following Acute Diisopropylfluorophosphate Intoxication in the Rat. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 1 août 2019;170(2):330-44.
64. Alshelh Z, Albrecht DS, Bergan C, Akeju O, Clauw DJ, Conboy L, et al. In-vivo imaging of neuroinflammation in Veterans with Gulf War Illness. *Brain Behav Immun*. juill 2020;87:498-507.
65. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*. 16 févr 2008;371(9612):597-607.
66. Eddleston M, Chowdhury FR. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *Br J Clin Pharmacol*. mars 2016;81(3):462-70.
67. Worek F, Thiermann H, Wille T. Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Arch Toxicol*. 2020;94(7):2275-92.

68. Dail MB, Leach CA, Meek EC, Olivier AK, Pringle RB, Green CE, et al. Novel Brain-Penetrating Oxime Acetylcholinesterase Reactivators Attenuate Organophosphate-Induced Neuropathology in the Rat Hippocampus. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 1 juin 2019;169(2):465-74.
69. Marrs TC. Diazepam in the treatment of organophosphorus ester pesticide poisoning. *Toxicol Rev*. 2003;22(2):75-81.
70. Abraham J, Fox PD, Condello C, Bartolini A, Koh S. Minocycline attenuates microglia activation and blocks the long-term epileptogenic effects of early-life seizures. *Neurobiol Dis*. 1 mai 2012;46(2):425-30.
71. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*. mars 2013;4(3):e525-e525.
72. Russmann V, Goc J, Boes K, Ongerth T, Salvamoser JD, Siegl C, et al. Minocycline fails to exert antiepileptogenic effects in a rat status epilepticus model. *Eur J Pharmacol*. 15 janv 2016;771:29-39.
73. Kwon YS, Pineda E, Auvin S, Shin D, Mazarati A, Sankar R. Neuroprotective and antiepileptogenic effects of combination of anti-inflammatory drugs in the immature brain. *J Neuroinflammation*. 26 févr 2013;10:30.
74. Andrew PM, Lein PJ. Neuroinflammation as a Therapeutic Target for Mitigating the Long-Term Consequences of Acute Organophosphate Intoxication. *Front Pharmacol*. 2021;12:674325.
75. Kodali M, Hattiangady B, Shetty GA, Bates A, Shuai B, Shetty AK. Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation and mitochondrial dysfunction in the hippocampus. *Brain Behav Immun*. mars 2018;69:499-514.
76. Ullah F, Asgarov R, Venigalla M, Liang H, Niedermayer G, Münch G, et al. Effects of a solid lipid curcumin particle formulation on chronic activation of microglia and astroglia in the GFAP-IL6 mouse model. *Sci Rep*. 11 févr 2020;10(1):2365.
77. Leibowitz JA, Ormerod BK. The potential of treating Gulf War Illness with curcumin. *Brain Behav Immun*. mai 2018;70:3-4.
78. Zhang CT, Lin JR, Wu F, Ghosh A, Tang SS, Hu M, et al. Montelukast ameliorates streptozotocin-induced cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology*. déc 2016;57:214-22.
79. Mansour RM, Ahmed MAE, El-Sahar AE, El Sayed NS. Montelukast attenuates rotenone-induced microglial activation/p38 MAPK expression in rats: Possible role of its antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic effects. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 nov 2018;358:76-85.
80. Fleck J, Temp FR, Marafija JR, Jesse AC, Milanesi LH, Rambo LM, et al. Montelukast reduces seizures in pentylenetetrazol-kindled mice. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2016;49(4):e5031.
81. Lai J, Hu M, Wang H, Hu M, Long Y, Miao M, et al. Montelukast targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 ameliorates A β 1-42-induced memory impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses in mice. *Neuropharmacology*. avr 2014;79:707-14.
82. Ghosh A, Chen F, Wu F, Tang S-S, Hu M, Long Y, et al. CysLT1R downregulation reverses intracerebroventricular streptozotocin-induced memory impairment via modulation of neuroinflammation in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 6 févr 2017;73:19-30.
83. Kawai Y, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Usui A, Komori K. Montelukast, a Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 Antagonist, Induces M2 Macrophage Polarization and Inhibits Murine Aortic Aneurysm Formation. *BioMed Res Int*. 2019;2019:9104680.

84. Marschallinger J, Schäffner I, Klein B, Gelfert R, Rivera FJ, Illes S, et al. Structural and functional rejuvenation of the aged brain by an approved anti-asthmatic drug. *Nat Commun.* 27 oct 2015;6:8466.
85. Poirier L, Jacquet P, Plener L, Masson P, Daudé D, Chabrière E. Organophosphorus poisoning in animals and enzymatic antidotes. *Environ Sci Pollut Res Int.* mai 2021;28(20):25081-106.
86. Chilcott RP, Dalton CH, Hill I, Davison CM, Blohm KL, Clarkson ED, et al. In vivo skin absorption and distribution of the nerve agent VX (O-ethyl-S-[2(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothioate) in the domestic white pig. *Hum Exp Toxicol.* juill 2005;24(7):347-52.
87. Rosenberg YJ, Wang J, Ooms T, Rajendran N, Mao L, Jiang X, et al. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques. *Toxicol Lett.* 1 sept 2018;293:229-34.
88. Pereira EFR, Aracava Y, DeTolla LJ, Beecham EJ, Basinger GW, Wakayama EJ, et al. Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *J Pharmacol Exp Ther.* août 2014;350(2):313-21.
89. Meek EC, Chambers HW, Coban A, Funck KE, Pringle RB, Ross MK, et al. Synthesis and in vitro and in vivo inhibition potencies of highly relevant nerve agent surrogates. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* avr 2012;126(2):525-33.
90. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp JoVE.* 30 juill 2012;(65):3564.
91. Chaubey K, Alam SI, Waghmare CK, Singh L, Srivastava N, Bhattacharya BK. Differential proteome analysis of rat plasma after diisopropyl fluorophosphate (DFP) intoxication, a surrogate of nerve agent sarin. *Chem Biol Interact.* 25 janv 2019;298:66-71.
92. Coban A, Carr RL, Chambers HW, Willeford KO, Chambers JE. Comparison of inhibition kinetics of several organophosphates, including some nerve agent surrogates, using human erythrocyte and rat and mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol Lett.* 25 avr 2016;248:39-45.
93. Rojas A, McCarren HS, Wang J, Wang W, Abreu-Melon J, Wang S, et al. Comparison of neuropathology in rats following status epilepticus induced by diisopropylfluorophosphate and soman. *Neurotoxicology.* mars 2021;83:14-27.
94. Phillips KF, Deshpande LS. Repeated low-dose organophosphate DFP exposure leads to the development of depression and cognitive impairment in a rat model of Gulf War Illness. *Neurotoxicology.* janv 2016;52:127-33.
95. Shih T-M, Hulet SW, McDonough JH. The effects of repeated low-dose sarin exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 sept 2006;215(2):119-34.
96. Rojas A, Ganesh T, Manji Z, O'Neill T, Dingleline R. Inhibition of the prostaglandin E2 receptor EP2 prevents status epilepticus-induced deficits in the novel object recognition task in rats. *Neuropharmacology.* nov 2016;110(Pt A):419-30.
97. Rojas A, McCarren HS, Wang J, Wang W, Abreu-Melon J, Wang S, et al. Comparison of neuropathology in rats following status epilepticus induced by diisopropylfluorophosphate and soman. *Neurotoxicology.* mars 2021;83:14-27.
98. Chauveau F, Van Camp N, Dollé F, Kuhnast B, Hinnen F, Damont A, et al. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* mars 2009;50(3):468-76.

99. Bertoglio D, Amhaoul H, Goossens J, Ali I, Jonckers E, Bijmens T, et al. TSPO PET upregulation predicts epileptic phenotype at disease onset independently from chronic TSPO expression in a rat model of temporal lobe epilepsy. *NeuroImage Clin.* 2021;31:102701.
100. Sridharan S, Lepelletier F-X, Trigg W, Banister S, Reekie T, Kassiou M, et al. Comparative Evaluation of Three TSPO PET Radiotracers in a LPS-Induced Model of Mild Neuroinflammation in Rats. *Mol Imaging Biol.* févr 2017;19(1):77-89.
101. Walker MD, Dinelle K, Kornelsen R, Lee NV, Miao Q, Adam M, et al. [11C]PBR28 PET imaging is sensitive to neuroinflammation in the aged rat. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* août 2015;35(8):1331-8.
102. Tuisku J, Plavén-Sigraý P, Gaiser EC, Airas L, Al-Abdulrasul H, Brück A, et al. Effects of age, BMI and sex on the glial cell marker TSPO — a multicentre [11C]PBR28 HRRT PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2019;46(11):2329-38.
103. Basu S, Zaidi H, Houseni M, Bural G, Udupa J, Acton P, et al. Novel Quantitative Techniques for Assessing Regional and Global Function and Structure Based on Modern Imaging Modalities: Implications for Normal Variation, Aging and Diseased States. *Semin Nucl Med.* 1 juin 2007;37:223-39.
104. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère J-J, Lindemann P, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* août 2006;27(8):402-9.
105. Wolf BJ, Brackhan M, Bascuñana P, Leiter I, Langer BLN, Ross TL, et al. TSPO PET Identifies Different Anti-inflammatory Minocycline Treatment Response in Two Rodent Models of Epileptogenesis. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* juill 2020;17(3):1228-38.
106. Saba W, Goutal S, Auvity S, Kuhnast B, Coulon C, Kouyoumdjian V, et al. Imaging the neuroimmune response to alcohol exposure in adolescent baboons: a TSPO PET study using 18 F-DPA-714. *Addict Biol.* sept 2018;23(5):1000-9.
107. Tournier N, Pottier G, Caillé F, Coulon C, Goislard M, Jégo B, et al. Nalmefene alleviates the neuroimmune response to repeated binge-like ethanol exposure: A TSPO PET imaging study in adolescent rats. *Addict Biol.* mai 2021;26(3):e12962.

ÉTUDE 2

Thérapie utilisant un inhibiteur réversible des acétylcholinestérases, le Donépézil, dans un modèle préclinique de la maladie d'Alzheimer

INTRODUCTION

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative du vieillissement la plus répandue. De nos jours, elle touche environ 36 millions de personnes dans le monde et chaque année 7 million de nouveaux cas sont déclarés (1). Cette maladie a été découverte en 1906, par le psychiatre et neurologue allemand Alois Alzheimer. Il a été le premier à identifier des lésions cérébrales spécifiques responsables de l'apparition de symptômes cliniques. Ces observations ont été possibles via l'étude du cas clinique de sa patiente Auguste Deter présentant de nombreux troubles cognitifs jusqu'alors inexplicables. L'augmentation du nombre de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a donné lieu à un grand nombre de recherches axées sur le développement de stratégies thérapeutiques visant à restaurer ou au moins à ralentir la progression du déclin cognitif (2). L'évolution de la maladie reste « discrète » jusqu'à l'apparition des premiers signes cliniques de déclin cognitif potentiellement évocateurs de cette dernière. Actuellement, le diagnostic clinique est un diagnostic clinico-biologique alliant un examen neurologique et un bilan neuropsychologique pour tester les fonctions cognitives (ex : Mini-Mental State Examination) d'une part et la recherche de marqueur de la neurodégénérescence par IRM et de marqueurs physiopathologiques par la ponction lombaire ou des examens en imagerie *in vivo* TEP. C'est alors en se basant sur un faisceau d'arguments et suite à l'élimination d'autres causes possibles que le diagnostic est posé. Le diagnostic de certitude quant à lui s'effectue uniquement en postmortem suite à une autopsie en procédant à des colorations/marquages histologiques des biomarqueurs de la MA au niveau cérébral (3).

La MA repose sur un continuum regroupant une multitude de processus physiopathologiques évoluant en parallèle (4). Elle peut se découper en trois grandes phases : la phase préclinique ou asymptomatique, la phase prodromale (Mild Cognitive Impairments= MCI) et la phase de démence. Durant la phase pré-symptomatique, aucuns déficits cognitifs ne sont cliniquement observables, les signes d'atrophie cérébrale à l'IRM ne sont pas détectables. Cependant, l'accumulation de protéines déficientes (A β , tau) et les processus neurodégénératifs débutent et on retrouve des taux anormalement élevés au niveau du tissu cérébral détectable par imagerie TEP *in vivo*. Cette phase peut durer plus d'une décennie. Au stade MCI, l'accumulation protéique s'accroît et se propage et les premiers signes d'atrophie cérébrale à l'IRM révèlent les processus de neurodégénérescence. Suite à ces processus pathologiques, les fonctions cognitives sont impactées notamment les mécanismes mnésiques faisant appel à la mémoire épisodique. Au

stade de démence, on assiste à une exacerbation sévère de l'atrophie cérébrale et des troubles cognitifs. Les patients perdent alors peu à peu leur indépendance.

La survenue de la maladie d'Alzheimer commence donc par l'apparition de biomarqueurs indicateurs de changements cérébraux spécifiques (accumulation protéique) avant l'installation de pertes neuronales responsables des déficiences neurologiques (Figure 40).

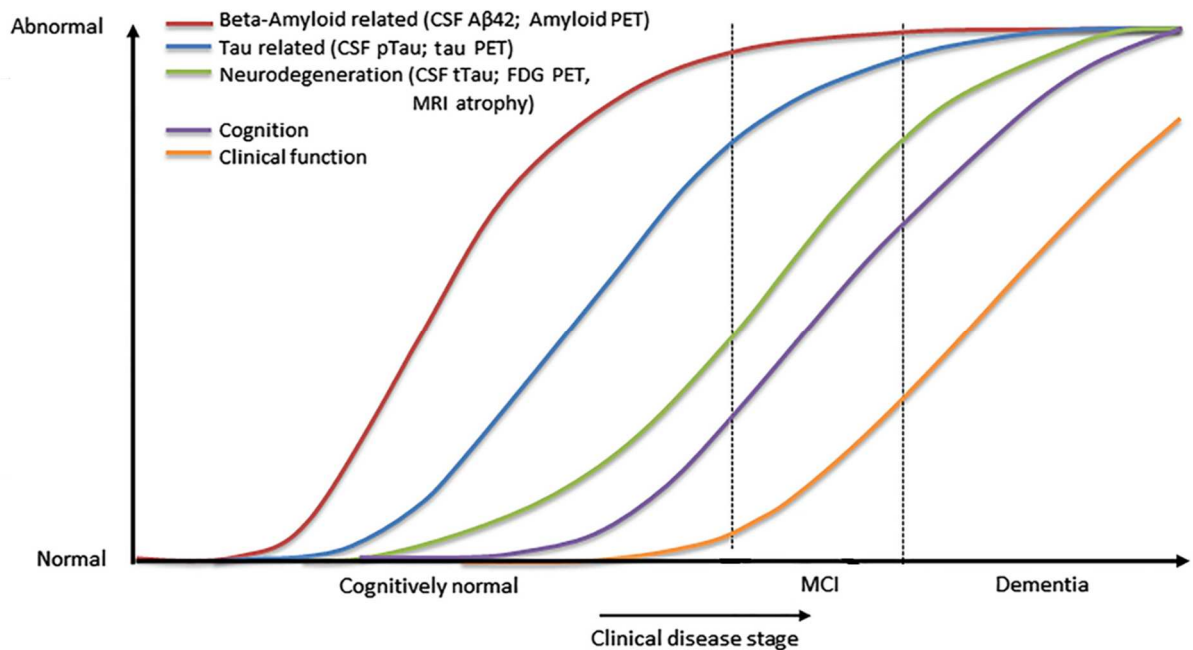


Figure 40: Continuum de la maladie d'Alzheimer. (Adapté de Grimmer et al, 2018)

La MA se décompose en trois grands stades (préclinique, MCI, et démence). La première phase consiste à la mise en place de la pathologie via divers mécanismes pathologiques (accumulation protéiques) sans modifier les fonctions cognitives des patients. Puis vient la phase Mild Cognitive Impairments (MCI) où les patients commencent à présenter des troubles cognitifs notamment mnésiques associés à une neurodégénérescence cérébrale. Puis les patients peuvent basculer en phase de démence où d'autres problèmes cognitifs apparaîtront laissant place à une perte d'autonomie pour les activités de la vie quotidienne.

La mise en place des différents phénomènes physiopathologiques observables dans la maladie d'Alzheimer va être abordé.

I. Une maladie multifactorielle : principaux phénomènes physiopathologiques.

1. Atrophie cérébrale

L'étude de l'atrophie cérébrale au cours du vieillissement non pathologique permet de mettre en lumière des modifications anormales sous tendues par des pathologies comme la maladie d'Alzheimer. Des études en imagerie structurale utilisant l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ont montré qu'une atrophie du volume cérébral total variant de 0.4 à 0.5% par an est considéré comme normal par contre si cette perte est supérieure à 1% par an elle est alors considérée comme anormale (5). Des changements au sein des volumes de matière grise et de matière blanche sont également largement étudiés. La perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer suit une progression stéréotypée avec une atteinte précoce et progressive des régions temporales antéro-internes comme le cortex entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe. Ce sont des régions clés pour évaluer l'atrophie cérébrale dans la maladie d'Alzheimer. L'atrophie hippocampique plus spécifiquement est un marqueur dans la progression de la maladie. En effet, une classification visuelle des stades d'atrophie du lobe temporal médian (ATM) a été mis en place dès les années 1990 et a été corrélée aux scores obtenus pour les tests mnésiques (6). L'échelle de Schletens utilisée permet de définir 4 grades allant de l'absence d'atrophie à une atrophie sévère de l'hippocampe (**Figure 41**).

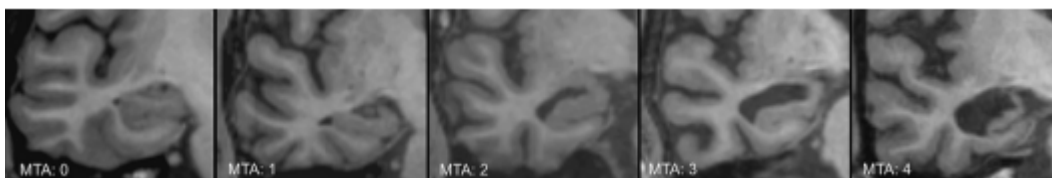


Figure 41 : Stades de Schletens pour l'atrophie hippocampique. (D'après Meike et al, 2012).

Images coronales de l'hippocampe, pondérées en T1, pour les stades 0 à 4 de l'échelle d'évaluation de l'ATM. Elargissement progressif de la fissure choroïde (à partir du stade 1) et de la corne temporale (à partir du stade 2) ainsi que la perte de volume du corps de l'hippocampe (stades 3 et 4).

Puis la dégénérescence neuronale s'étend progressivement aux régions corticales temporales, pariétales et frontales soulignant des stades plus avancés de la MA. Ce type de progression est la plus commune, cependant depuis, des études morphométriques sur des données IRM ont permis de déterminer différents sous-types d'atrophies démontrant l'hétérogénéité de la MA (7).

La neurodégénérescence observable serait attribuée à la mise en place de mécanismes pathologiques à l'échelle cellulaire. Je vais détailler ces phénomènes pathologiques caractéristiques de la MA.

2. Accumulation de protéines mal conformées

Cette maladie neurodégénérative, sous-tendant certaines démences, est considérée comme étant une « protéinopathie » suite à une accumulation pathologique de protéines déficientes dans le cerveau (8).

a. Les plaques amyloïdes

Un des évènements majeurs de la pathologie est l'accumulation d'une protéine mal conformée au sein du système nerveux central : le peptide A β . L'identification de ce peptide de 39 à 43 acides aminés (4 kDa) a été effectuée en 1980 via la purification de dépôts amyloïdes microvasculaires obtenus au niveau des méninges de patients Alzheimer (9). Après cette découverte, une étude a également confirmé que ce peptide était l'un des principaux composants des plaques amyloïdes retrouvées au niveau de cortex de patients (10).

Ce peptide est généré suite à une endoprotéolyse de la protéine transmembranaire nommée APP (Amyloid precursor protein). Le clivage de l'APP en différents fragments est effectué par un groupe d'enzymes nommées α - ; β - ; et γ -secrétases. Le processus de clivage de l'APP peut être divisé en deux grandes voies : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique **(Figure 42)**.

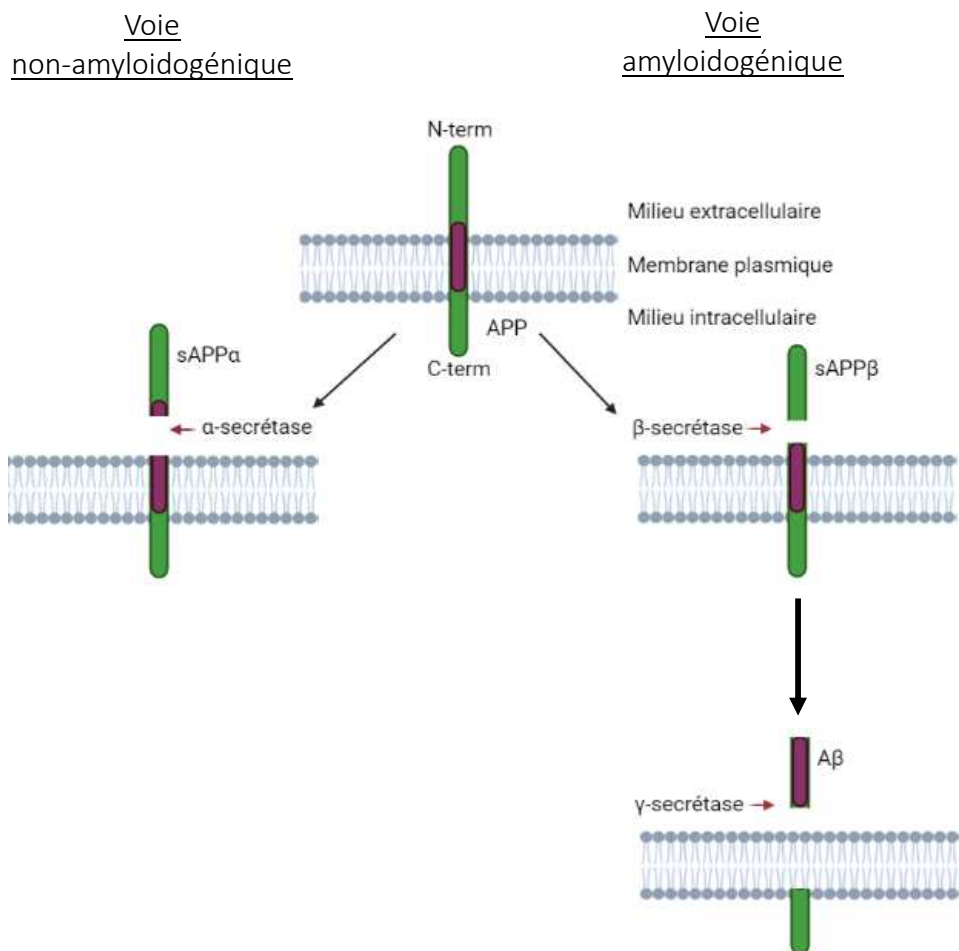


Figure 42: Clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

L'APP est situé au niveau des membranes plasmiques des cellules. En conditions physiologiques, cette protéine va être clivée par une enzyme l' α -sécrétase au niveau de la séquence du peptide A β (en violet ici) rendant alors impossible son accumulation dans le milieu extra-cellulaire. Par contre, d'autres enzymes comme la β -sécrétase et le complexe enzymatique γ -sécrétase peuvent également cliver l'APP et libérer le fragment A β dans le milieu extracellulaire provoquant ainsi son accumulation qui sera néfaste pour le système nerveux.

L' α -sécrétase va cliver l'APP à l'intérieur de la région A β rendant impossible la formation du peptide, on parle alors de voie non-amyloïdogénique. La voie amyloïdogénique assurée par l'action de la β -sécrétase et du complexe enzymatique γ -sécrétase (composé de la préséniline 1 (PS1) ou 2 (PS2), la nicastrine, APH-1 (anterior pharynx-defective 1) et de la PEN-2 (presenilin enhancer-2) est à l'origine de la production du peptide A β (11). Cet enchainement de réactions enzymatiques génère alors l'accumulation dans le milieu extracellulaire de différents fragments de l'APP (A β 35 ; A β 40 et A β 42) sous formes monomériques solubles. Une fois relâchées dans le milieu extracellulaire, ces protéines vont subir des modifications de leur conformation secondaire

permettant d'enclencher le processus d'agrégation protéique communément appelé la cascade d'agrégation amyloïde. Les structures secondaires de ces monomères à l'état natif sont constituées jusqu'à 70% d'hélice α . Suite à leurs interactions avec les molécules présentes dans le milieu extracellulaire, les monomères vont s'enrichir en feuillets β modifiant ainsi leur conformation. Les monomères mal conformés vont s'attacher entre eux pour former des intermédiaires solubles oligomériques en conformation feuillets β . Puis l'agglomération des oligomères solubles va engendrer la création de protofibrilles menant ensuite au dernier stade qui est la formation des fibrilles amyloïdes insolubles composées essentiellement de feuillets β (12). Les fibrilles amyloïdes sont formées de structures cross- β caractéristiques, dans lesquelles les feuillets β multicouches forment des brins perpendiculaires à l'axe de la fibrille forment ainsi le noyau amyloïde (13).

Ce type de cascade d'agrégation n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer. En effet, d'autres protéinopathies comme la maladie de Parkinson ou les maladies à prions présentent une accumulation de protéines spécifiques (α -synucléine ou PrP respectivement) suivant le même schéma d'agglomération (Figure 43).

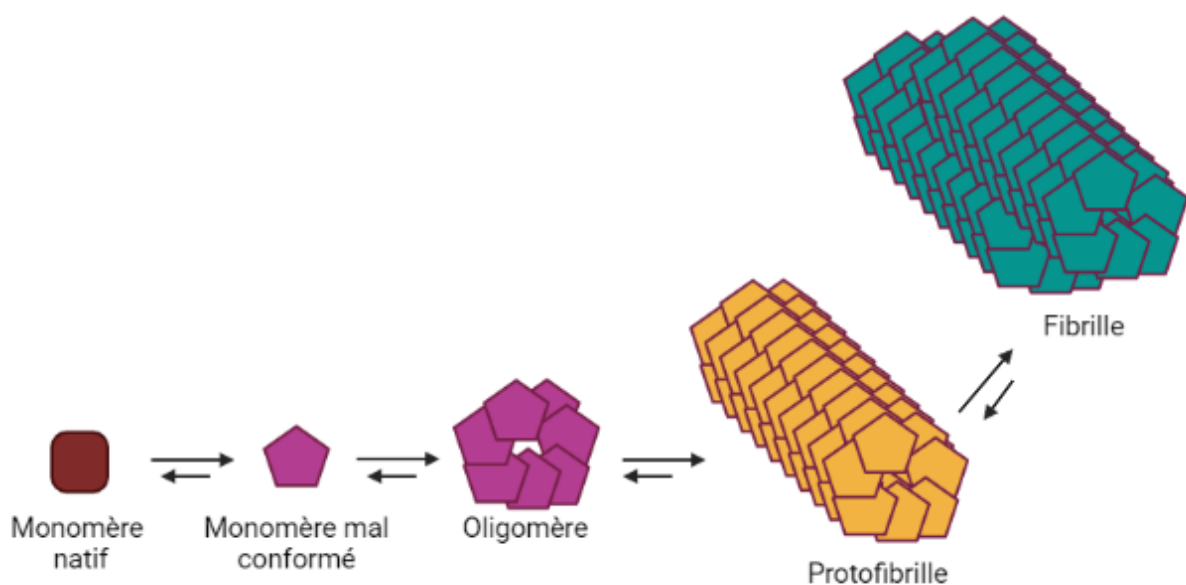


Figure 43: Schéma du processus d'agrégation des protéines formant les fibrilles.

Les premières découvertes sur les mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer et l'hypothèse de la cascade amyloïde plaçaient les fibrilles amyloïdes suite à l'agrégation du peptide A β dans le milieu extracellulaire comme étant les formes conformationnelles les plus cytotoxiques. En effet, les fibrilles d'A β étaient tenu responsable de la neurodégénérescence observée (14). Cependant, aucune corrélation n'avait été trouvée entre la charge amyloïde et le déclin cognitif (15).

Dès lors la découverte de la mécanistique du processus d'agrégation des monomères d'A β a permis de repositionner les fibrilles comme étant les espèces chimiques les plus stables et les moins « toxiques » en les considérant comme inertes comparées aux états oligomériques du peptide A β . La toxicité cellulaire serait en partie engendrée par les espèces A β oligomériques solubles (16). En effet, des études biochimiques ont montrées que les niveaux de l'A β soluble étaient corrélés à la présence et aux degrés des déficits cognitifs observés (17,18). Les oligomères seraient responsables de modifications sévères et permanentes de la fonction synaptique et provoqueraient des morts neuronales (19).

L'évolution de la dynamique des dépôts amyloïdes (fibrilles) à travers le SNC a pu être établie grâce à des analyses post mortem de cerveaux de patients Alzheimer. Des marquages immunohistochimiques sur toutes les régions cérébrales y compris celles du tronc cérébral ont permis de déterminer des stades de propagation du peptide A β . Cinq phases ont été caractérisées regroupées sous la dénomination les stades de Thal (20). En phase 1, les dépôts amyloïdes sont exclusivement retrouvés au niveau du néocortex. Puis, ils commencent à envahir d'autres zones cérébrales comme l'allocortex comprenant l'hippocampe en phase 2. Au cours de la troisième phase, les noyaux diencephaliques, les noyaux cholinergiques et le striatum sont atteints. En phase 4, le peptide A β s'agrège dans d'autres noyaux du tronc cérébral. En ce qui concerne la dernière phase, le cervelet sera la dernière région à être touchée par la pathologie amyloïde (**Figure 44**).

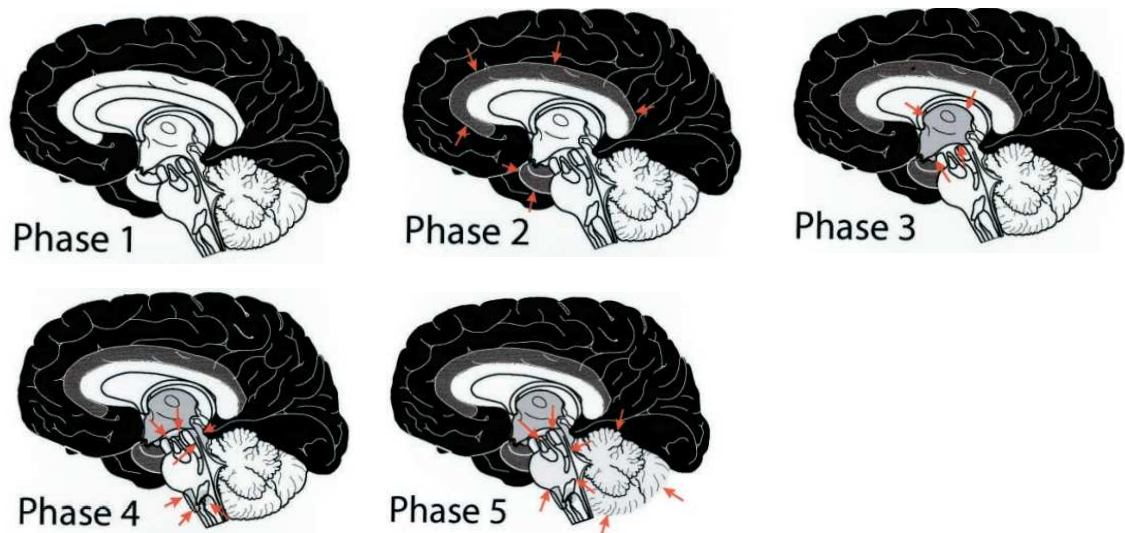


Figure 44: Propagation des dépôts amyloïdes selon les stades de Thal (D'après Thal et al, 2002).

Phases de l'amyloïdose. La phase 1 est caractérisée par des dépôts amyloïdes (A) exclusivement néocorticaux (Néocortex : noir). La phase 2 montre des dépôts A allocorticaux supplémentaires (flèches rouges), phase 3 des dépôts A supplémentaires dans les noyaux diencephaliques (flèches rouges) et le striatum (non montré), phase 4 : dépôts supplémentaires de A dans des noyaux distincts du tronc cérébral (substance noire, noyau rouge, gris central, collicule supérieur et inférieur, etc. et inférieur, noyau olivaire inférieur et zone réticulaire intermédiaire) (flèches rouges), et la phase 5 dans le cervelet et des noyaux supplémentaires du tronc cérébral (noyaux pontins, locus coeruleus, noyaux parabrachial, noyau réticulo-tegmental, noyau tegmental dorsal et noyaux du raphé) (flèches rouges).

b. Les dégénérescences neurofibrillaires

La maladie s'accompagne également d'un processus d'agrégation intra-cellulaire nommé dégénérescences neurofibrillaires (NFTs). C'est dans les années 1980 que la protéine responsable de ces agrégats a pu être identifiée sous le nom de protéine Tau. Cette protéine a été localisée au niveau du cytosquelette des neurones (21). Elle fait partie de la famille des MAP (Microtubule Associated Protein). Sa séquence d'acides aminés est composée de motifs d'aa répétés noté R. Il existe deux variants de la protéine tau, les protéines constituées de 3 motifs R (3R) et celles qui en comportent 4 (4R). Son association aux microtubules est permise grâce aux motifs R qui servent de points d'ancrage. Son rôle principal est de permettre l'assemblage des microtubules ainsi que de maintenir leur stabilité (22). Cette protéine permet d'assurer ainsi le bon fonctionnement du transport axonal dépendant de la cyto-architecture neuronale. En conditions physiologiques, cette protéine subit des modifications post-traductionnelles de maturation comme la phosphorylation de certains sites d'acides aminés. Cependant, une hyperphosphorylation de cette protéine est retrouvée sur certains épitopes considérés comme pathologiques dans le cadre de la MA (23). Le

processus d'hyperphosphorylation de cette protéine va diminuer voire entraîner une perte de son affinité envers les microtubules menant ainsi à une perturbation de la stabilité de ces derniers (24). Ces événements de phosphorylation assurés par des kinases serait également précurseur de l'agrégation des protéines tau suite à la modification de leur conformation. A l'image de la cascade amyloïde, les protéines tau hyperphosphorylées vont s'attacher les unes aux autres afin de former in fine les dégénérescences neurofibrillaires. Les NFTs sont principalement constitués de faisceaux de filaments hélicoïdaux appariés (PHF) semblables à deux rubans torsadés avec un espacement entre les croisements d'environ 80 nm et d'une largeur comprise entre 10 et 30 nm (Figure 45) (25).

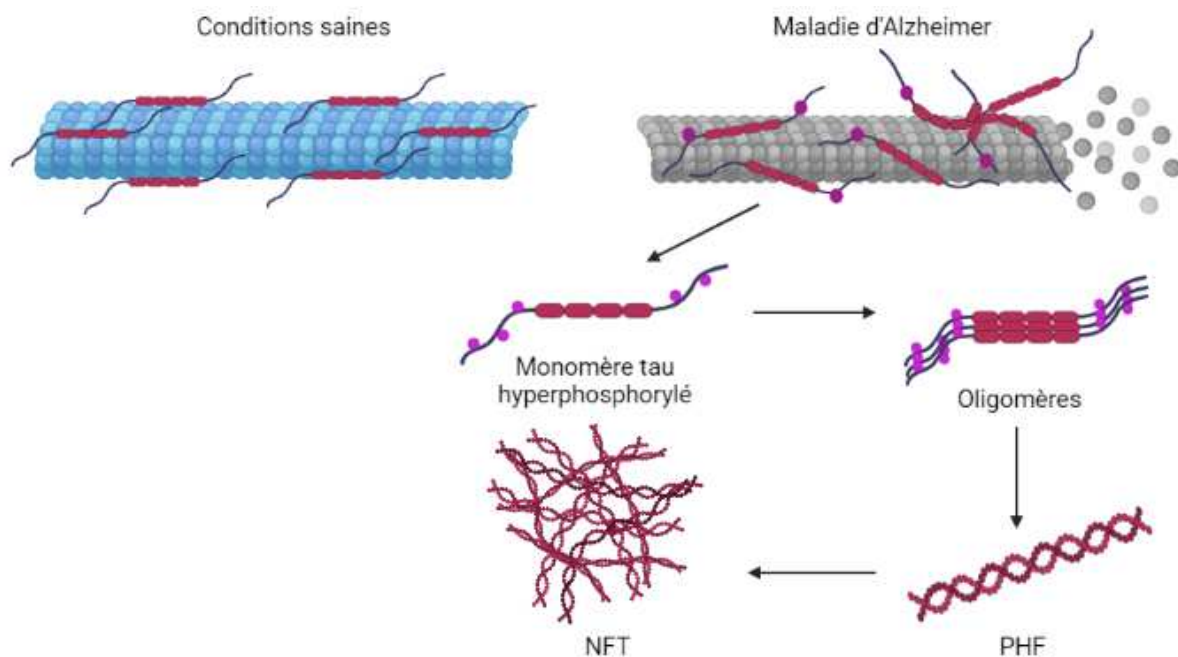


Figure 45: Processus d'agrégation de la protéine tau.

Les protéines tau ayant des motifs 4R ici (en rouge) vont s'ancrer au niveau des microtubules en conditions physiologiques pour maintenir leur stabilité. Dans la MA, la phosphorylation de certains sites (ronds violets) va provoquer un décrochage des protéines tau sur les microtubules augmentant ainsi les protéines tau hyperphosphorylées dans le milieu intracellulaire. Les monomères solubles vont alors s'attacher entre eux pour former des oligomères puis des filaments hélicoïdaux (PHF) avant d'obtenir la dernière forme d'agrégation les NFTs.

Le désassemblage des microtubules dû à la phosphorylation des protéines tau accompagné de la présence d'obstacles physiques tels que les oligomères entraînent un dérèglement du système de transport assuré au sein du neurone menant à des dysfonctionnements cellulaires responsables de la mort neuronale.

La dissémination des dégénérescences neurofibrillaires suit également un schéma

prototypique caractéristique établi par Braak (26). Le système de classification propose six stades de progression de la MA. A des stades précoces (I-II), les agrégats sont présents au niveau de la région trans-entorhinale et de la formation hippocampique. Puis, ils commencent à s'accumuler au niveau du néocortex temporal, pariétal et frontal aux stades III et IV. Les dernières régions cérébrales touchées sont les aires sensorielles et motrices primaires du néocortex aux stades V et VI (**Figure 46**). Contrairement aux plaques amyloïdes, la présence et le taux de NFT au niveau de certaines régions cérébrales corrént avec les dysfonctionnements cognitifs observables chez les patients MA (27). En parallèle de ces dépôts de NFTs, les désordres cognitifs cliniquement observés commencent par une altération de la mémoire des événements récents et une légère perturbation de l'orientation spatiale chez le sujet tout en préservant un fonctionnement cognitif général acceptable sans impact majeur dans la vie quotidienne (28). Aux stades intermédiaires, divers troubles font leur apparition comme une altération plus problématique de la mémoire suite à une difficulté à trouver ces mots, une désorientation dans l'espace-temps, des troubles de la concentration, de la compréhension et de la conceptualisation (29). Aux derniers stades de propagation, le patient a des problèmes perceptifs et moteurs (30).

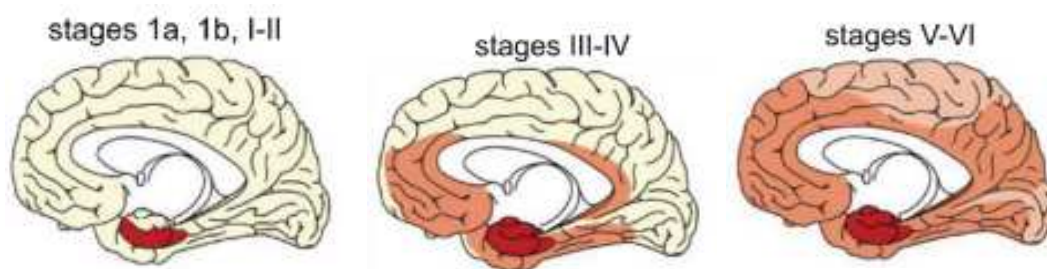


Figure 46: Schéma de la propagation des dégénérescences neurofibrillaires. (Adapté de Braak et al 2013) (31)

Nuances de couleur : stades 1a et 1b du prétriangle cortical et stades I-II de la NFT (rouge foncé), stades III-IV des NFTs (rouge clair) et stades V-VI des NFTs (rose). Les dessins montrent la progression systématique du processus pathologique à partir des régions trans-entorhinales et entorhinales (stades I-II des NFTs) aux aires d'association néocorticales de haut niveau (stades III-IV des NFTs) et, enfin, aux aires secondaires et primaires du néocortex (stades V-VI des NFTs).

L'étude de la propagation stéréotypée des deux marqueurs typiques de la maladie d'Alzheimer, par Thal pour les plaques amyloïdes et par Braak pour les dégénérescences neurofibrillaires a permis l'émergence d'une hypothèse scientifique récente : l'hypothèse prion.

c. L'hypothèse prion

Des études ont montré que les deux protéines ($A\beta$ et tau) retrouvées dans la MA étaient capables de se propager à travers le système nerveux central selon un mécanisme de transmission proche de la protéine prion (PrP) responsable de la maladie de Creutzfeldt Jacob (32).

En effet, ces deux protéines partagent des propriétés proches de la PrP notamment la présence lors du processus d'agrégation de formes intermédiaires mal repliées et riches en feuillets β . Ces formes intermédiaires d' $A\beta$ et tau seraient alors capables de s'autopropager et d'imposer leur conformation aux protéines natives enclenchant ainsi leur agglomération. Une étude a mis en évidence que l'injection d'homogénats de cerveaux humains chez des marmosets sains a entraîné l'apparition de plaques amyloïdes des mois après l'injection mise en évidence en post-mortem (33). Depuis de nombreuses études se sont intéressées au mécanisme de propagation (34). Ce phénomène se base sur le processus de nucléation dite secondaire. En effet, les différents stades d'agglomération protéiques sont très dynamiques. La nucléation primaire est caractérisée par le passage du stade monomérique au premier fragment fibrillaire. Cette phase est assez lente à se mettre en place. Cependant, durant la phase d'élongation des fibrilles, une fragmentation peut avoir lieu générant ainsi des formes intermédiaires protofibrillaires ou oligomériques agissant comme des « souches » et facilitant la genèse d'autres formes fibrillaires d' $A\beta$ et tau (**Figure 47**). Ce phénomène de nucléation secondaire permet ainsi d'augmenter la vitesse de formation et de propagation des formes protéiques responsables de la MA (35,36).

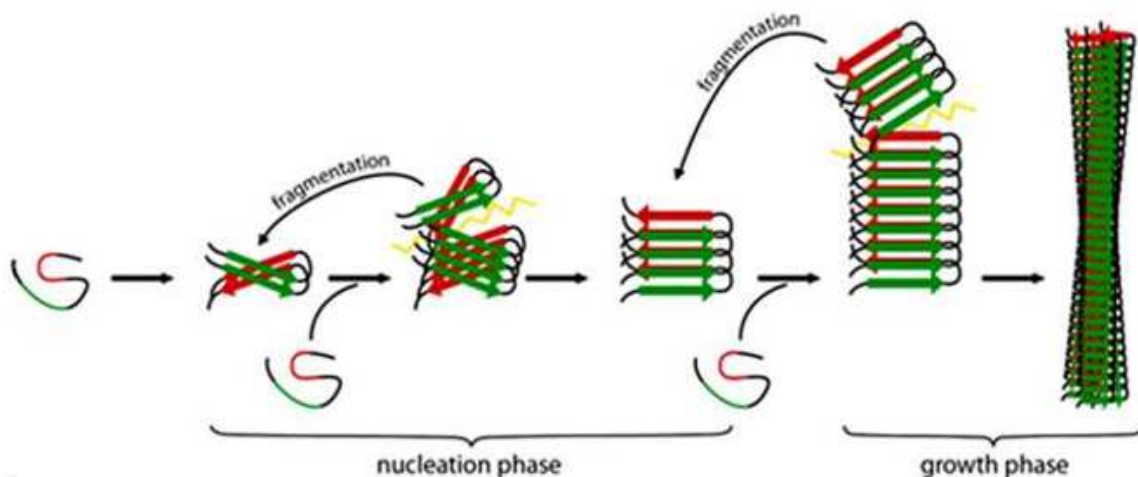


Figure 47: Phénomène de nucléation dans les protéinopathies (D'après Jucker et al 2013)

Lors du processus d'agrégation, en phase d'élongation un phénomène de nucléation secondaire se met en place fractionnant ainsi des formes protofibrillaires ou oligomériques pour former des assemblages protéiques plus petits solubles agissant comme des souches pour la genèse d'autres formes fibrillaires.

3. Atteinte du système cholinergique

Le système cholinergique a été étudié très tôt dans le cadre de la MA. En effet, diverses études ont démontré une atteinte précoce des voies cholinergiques chez les patients Alzheimer. Parmi les découvertes scientifiques, trois d'entre elles ont contribué à donner naissance à l'hypothèse cholinergique, positionnant cette dernière comme un élément clé dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer. En effet, la sensibilité du système cholinergique à la toxicité amyloïde et tau entraîne une altération bien caractérisée des neurones cholinergiques dans le noyau basal magnocellulaire, ou noyau de Meynert chez l'Homme (37,38). Pour appuyer ces observations, une étude a récemment montré que la dégénérescence précoce de ces noyaux serait due en partie à l'instauration de la pathologie tau. Les taux anormaux de protéines tau hyperphosphorylées retrouvées dans le liquide céphalo rachidien seraient corrélés à une diminution bilatérale du volume des noyaux cholinergiques situés au niveau du tronc cérébral (39).

Dès les années 1970, une équipe a souligné une diminution de l'activité enzymatique de la ChAT, marqueur présynaptique cholinergique à l'origine de la synthèse d'acétylcholine au niveau du cortex cérébral, lieu de projections cholinergiques du noyau de Meynert (40). Chez les patients déments, une baisse significative de l'activité de cette enzyme a été montrée avec l'augmentation du nombre de plaques amyloïdes. Dans cette même étude la diminution de son activité a été corrélée aux troubles intellectuels mesurés par des tests mnésiques (41). De plus, des observations cognitives suite à l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs cholinergiques (scopolamine) chez des sujets sains soulignent une perturbation des aptitudes mnésiques semblables à des patients âgés (42).

Avec ces découvertes un dysfonctionnement précoce de la neurotransmission synaptique cholinergique a été proposé comme un marqueur clé dans la MA. Dès lors, d'intenses investigations ont été menées afin d'évaluer les modifications du système cholinergique ainsi que les causes de son dysfonctionnement. Malgré une perte évidente des voies cholinergiques sous-tendant une perturbation cérébrale notamment des fonctions mnésiques, des modifications plus subtiles ont pu être observées. Un changement de l'expression des récepteurs cholinergiques nicotiques ou muscariniques est observée qu'ils soient situés en pré ou post-synaptique (43,44). Une étude a été menée sur les marqueurs pré-synaptique (enzyme ChAT) et post-synaptiques (récepteurs muscariniques) chez 87 sujets atteints ou non de pathologie amyloïde. Les résultats montrent que ces deux marqueurs sont significativement diminués chez les sujets âgés non

déments présentant des plaques amyloïdes et que cette diminution est plus prononcée chez les sujets atteints de MA (45).

L'interaction étroite entre la pathologie amyloïde, tau et le système cholinergique entraîne un dysfonctionnement de la communication neuronale cholinergique qui est cependant indispensable pour le maintien de certaines fonctions cognitives mnésiques.

Pour contrecarrer les effets néfastes observables sur le système cholinergique, des approches non fondées sur la mécanistique des processus ont été envisagées par les cliniciens pour limiter le déclin cognitif. Cela inclut la prescription d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) tels que le Donépézil qui est indiqué pour le traitement symptomatique de la MA légère à modérée (46). L'inhibition spécifique et réversible de l'AChE par le Donépézil retarde l'hydrolyse de l'acétylcholine et maintient les niveaux d'acétylcholine dans la fente synaptique. Le Donépézil peut donc aider à compenser la perte de neurones cholinergiques fonctionnels observée chez les patients atteints de la MA. Au stade préclinique, les tests comportementaux ont clairement montré l'effet positif du Donépézil sur les performances cognitives. Cependant, chez les patients, l'impact positif du Donépézil sur la fonction cognitive est difficile à évaluer et semble être modeste. Depuis plusieurs années, la HAS (Haute autorité de santé) a autorisé ces thérapies afin d'améliorer en premières intentions les symptômes cognitifs des patients atteints de la MA. Depuis 2018, l'HAS a décidé le déremboursement de ces thérapies en France considérant que les bénéfices d'une telle thérapie sont insuffisants comparés aux effets secondaires que cela peut engendrer. Alors qu'il n'existe pour l'heure aucune thérapie curative de la maladie d'Alzheimer, l'efficacité clinique des traitements pharmacologiques ciblant directement le fonctionnement du système nerveux central sont remis en cause. Des méthodes sont donc nécessaires pour évaluer l'impact du Donépézil sur la fonction cérébrale des patients atteints de la MA.

Les troubles d'apprentissage et de mémoire associés à la dégénérescence du système cholinergique ont été confirmés chez des souris ayant reçu une injection intracérébroventriculaire (i.c.v) du peptide $A\beta_{25-35}$ confirmant ainsi l'implication de la toxicité amyloïde sur le système cholinergique (47).

En utilisant ce modèle, Meunier et ses collègues ont montré que le Donépézil est capable d'atténuer les déficits de mémoire tout en protégeant contre la toxicité induite par le peptide $A\beta_{25-35}$ (48). Cependant, le lien entre la perte cognitive induite par la toxicité intrinsèque du peptide $A\beta_{25-35}$, la formation de plaques séniles et la diminution régionale des fonctions cérébrales reste à étudier en tant que déterminants moléculaires de l'impact positif du Donépézil.

La compréhension croissante de l'étiologie complexe et multifactorielle de la MA a conduit au développement de stratégies basées sur des mécanismes ciblant les plaques de bêta-amyloïde (A β), les dépôts de protéine Tau, la fonction de l'apolipoprotéine-E (ApoE), la neuroprotection ou la neuroinflammation (49). La plupart des modèles animaux de la MA ont été développés pour récapituler ces lésions histopathologiques clés *in vivo* (50). Ils offrent des outils inestimables pour tester l'efficacité préclinique des traitements de la MA.

Dans ce cadre, la preuve de concept mécanique et le transfert clinique peuvent être réalisés grâce à la disponibilité de techniques d'imagerie translationnelle utilisant les biomarqueurs correspondants (51).

II. Imagerie TEP des biomarqueurs de la MA

1. Pour un suivi de l'évolution de la maladie

a. Imagerie TEP du métabolisme cérébral du glucose

Le dérivé fluoré du glucose, le 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG), est largement utilisé pour estimer la consommation de glucose dans les régions du cerveau associées à l'activité neuronale dans de nombreuses conditions pathophysiologiques (52). Il est utilisé pour mesurer indirectement l'activité synaptique nécessitant une importante dépense énergétique. Dans la MA, un hypométabolisme du glucose est observé des années avant l'apparition des symptômes cognitifs (**Figure 48**) (53). En 2018, les nouveaux critères diagnostiques de la MA incluent le [¹⁸F]FDG comme biomarqueur de neurodégénérescence (54). De plus, le diagnostic de la MA via l'utilisation de la TEP FDG atteint une sensibilité de 94 % et une spécificité de 73 % par rapport à l'histopathologie (55). Le pouvoir prédictif de ce biomarqueur est utilisé en clinique pour prédire l'apparition de troubles cognitifs chez des sujets sains ou le passage des patients MCI dans le stade de démence (56,57).

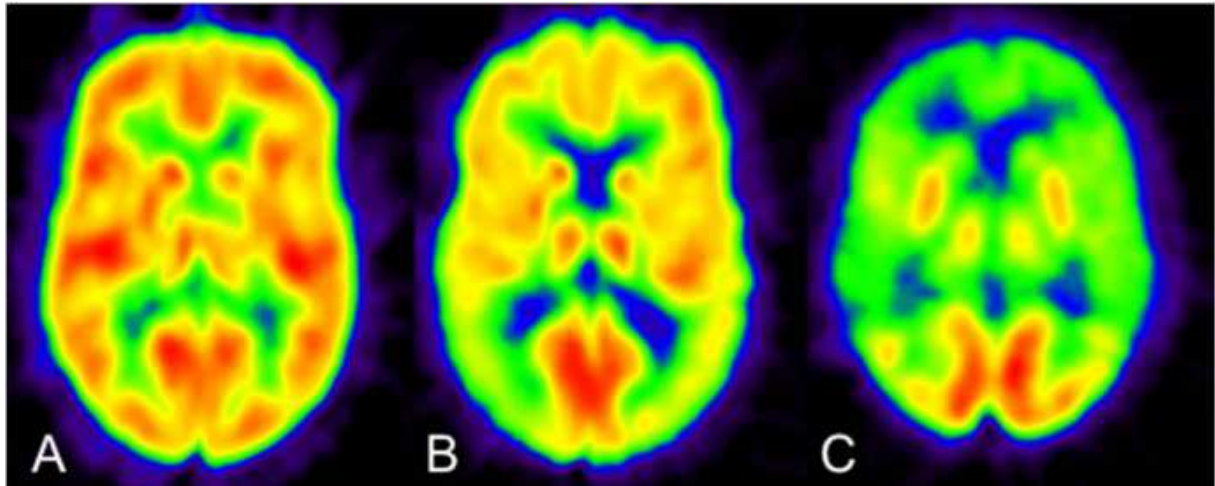


Figure 48: TEP au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ chez des sujets sains, suspectés ou avec une MA avancée. (D'après Rice et al, 2017) (58)

(A) TEP FDG d'un sujet sans troubles cognitifs, (B) d'un patient suspecté d'être atteint de la maladie d'Alzheimer précoce (C) et d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer avancée. Le sujet sain présente un schéma de distribution du FDG cortical dans la substance grise, les ganglions de la base et les thalamus. Le patient suspecté de MA présente une réduction évidente du métabolisme du glucose dans la région pariétale (plus prononcée) et, secondairement, dans la région frontotemporale et les ganglions de la base. Le taux régional cérébral du glucose est gravement altéré chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer avancée, avec une activité résiduelle du traceur sur les thalamus et les ganglions de la base.

b. Imagerie TEP des agrégats protéiques

Des radiopharmaceutiques ont été développés en imagerie TEP pour permettre la visualisation de manière non invasive *in vivo* des différents biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. Ces radiotraceurs sont capables de suivre *in vivo* l'invasion progressive cérébrale des biomarqueurs protéiques de la MA ($\text{A}\beta$ et tau). En effet, les résultats obtenus *in vivo* coïncident avec la progression de la pathologie amyloïde et tau caractérisées par des analyses post-mortem de tissus cérébraux des décennies auparavant par Thal et Braak respectivement (59,60).

Un des premiers radiotraceurs à avoir été développé pour cibler $\text{A}\beta$ a été le [N-méthyl- ^{11}C]-2-(4'-méthylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ($[^{11}\text{C}]\text{-PiB}$), communément appelé Pittsburgh Compound B (PiB). C'est un dérivé de la Thioflavine-T utilisé depuis des décennies pour marquer les plaques amyloïdes en post-mortem via des marquages histologiques. Klunk et ses collaborateurs ont été les premiers à tester ce composé chez l'homme en 2004. Le groupe d'étude a comporté des patients Alzheimer et des contrôles (jeunes et âgés), ils ont mis en évidence chez les patients une rétention importante du $[^{11}\text{C}]\text{-PiB}$ dans les aires associatives du cortex connues pour être impliquées dans la pathologie amyloïde (cortex frontal, pariétal, temporal et occipital). Ils ont également montré qu'une faible fixation était observée dans des zones assez préservées de

la pathologie comme le tronc cérébral et le cervelet. Aucune différence n'a été observée au niveau cortical entre les sujets sains jeunes et âgés (61). Ces observations confirment qu'il y a une fixation spécifique de ce composant chez les personnes atteints de la MA. Une autre étude appuie ces conclusions en utilisant des méthodes de modélisation pharmacocinétique (Figure 49) (62). Depuis, d'autres ligands marqués cette fois-ci au fluor 18 ont été développés comme le [¹⁸F]Florbetapir ([¹⁸F]AV45) et le [¹⁸F]Florbetaben. Une étude clinique, a montré que la sensibilité et la spécificité de l'imagerie TEP au [¹⁸F]Florbetapir pour la détection des plaques modérées à fréquentes étaient de 92 % et de 100 % respectivement (63). Des études récentes ont démontré une corrélation entre l'imagerie TEP *in vivo* utilisant des ligands se fixant aux plaques amyloïdes et les observations post-mortem de la charge amyloïde (64).

La limitation de ces radiotraceurs est qu'ils se fixent uniquement aux formes matures c'est à dire aux formes fibrillaires insolubles d'Aβ (les plaques amyloïdes). En effet, ce sont des molécules assez planaires pouvant se fixer au niveau de gros assemblages protéiques organisés en feuillet β. Toutes les formes oligomériques solubles considérées comme les formes les plus toxiques de nos jours ne peuvent donc pas (ou pas encore) être imagées *in vivo*.

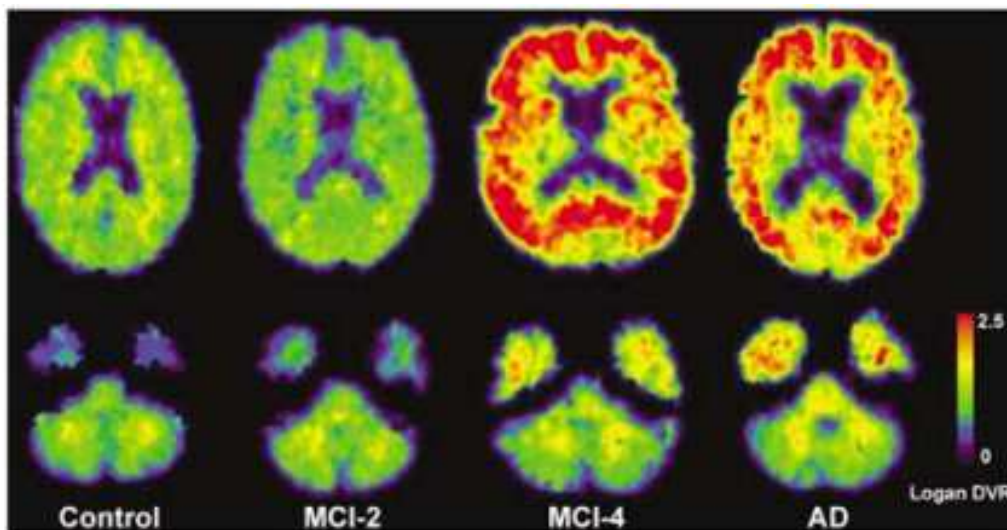


Figure 49: Fixation cérébrale du [¹¹C]-PiB. (D'après Price et al, 2005).

Exemples du composé B de Pittsburgh (PiB). Images Logan d'un témoin (C-5), d'une déficience cognitive légère (MCI-2) cognitif léger (MCI) (MCI-2), un MCI de type AD (MCI-4) et d'un sujet AD (AD-1) présentant la plus forte rétention de PiB. Les images ont été générées à partir des données du plasma artériel et d'une analyse de 90 minutes. Les images DVR reflètent une plus grande liaison du PiB dans de nombreuses zones corticales du sujet AD et du sujet MCI. Des valeurs DVR similaires ont été mesurées dans le cervelet dans tous les groupes de sujets (62).

Dans les années 2000, seule l'imagerie TEP-amyloïde était accessible pour étudier un des marqueurs protéiques de la MA. Les études TEP menées à cette période ne prenaient donc pas en compte l'impact de la pathologie tau sur la cognition et la neurodégénérescence.

Plus récemment, le développement des radiotraceurs ciblant cette fois-ci la protéine tau est en pleine expansion. De nombreux radiotraceurs ont été développés, parmi eux, des radiotraceurs fluorés comme le flortaucipir (AV-1451), le THK5351, THK5317 sont actuellement utilisés et d'autres ligands de seconde génération sont en cours de développement (65). Ces radiotraceurs se fixent spécifiquement aux motifs répétés 3R ou 4R retrouvés sur la protéine tau (66). L'utilisation du [¹⁸F]flortaucipir a démontré que sa distribution cérébrale était un marqueur de la neurodégénérescence et des symptômes cliniques observés (67). L'imagerie TEP tau assurée par ces ligands serait un bon moyen de prédire le déclin cognitif des patients comparé aux autres biomarqueurs de la MA (68).

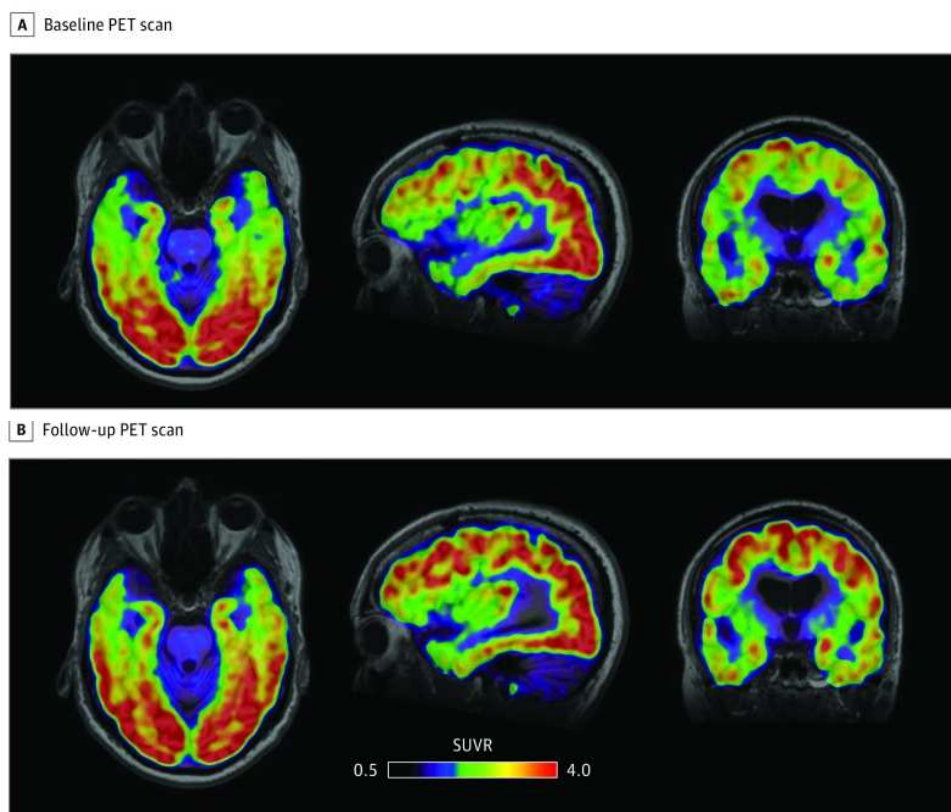


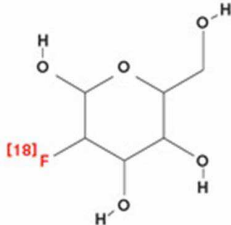
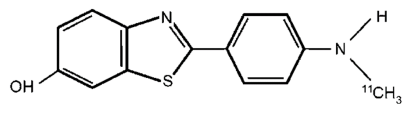
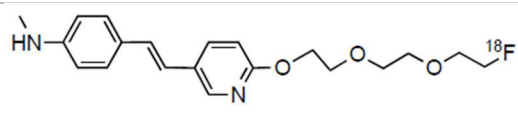
Figure 50: Images cérébrales TEP utilisant le [¹⁸F]Flortaucipir (D'après Smith et al, 2019)

A, images SUVR de la TEP acquise 32 mois avant le décès du patient. B, images SUVR de la TEP de suivi réalisée 12 mois avant le décès du patient.

L'imagerie TEP est primordiale pour la mise en place d'études longitudinales permettant de suivre l'évolution de l'accumulation de ces protéines *in vivo* sous-tendant la progression de la pathologie Alzheimer (Figure 50) (69).

c. Imagerie TEP du système cholinergique

Le système cholinergique grandement impliqué dans la pathologie Alzheimer peut également être investigué *in vivo* via la production de radiotraceurs spécifiques. Le N-[¹¹C]methylpiperidyl propionate ([¹¹C]PMP) initialement développé permet d'évaluer l'activité des acetylcholinestérases. En effet, une grande accumulation de ce dernier est observée au niveau des zones cérébrales (striatum, cortex) connues pour avoir une importante activité des AchE (70). Ce radiotracer est hydrolysé par les AChE avec une spécificité de 95%. Il a été utilisé pour investiguer de manière non invasive l'activité des AChE chez des patients atteints de la MA (71). Une réduction de l'activité des AChE de 25 à 33% au niveau cortical a été mise en évidence chez les patients Alzheimer (72). Une étude plus récente a également montré une baisse d'activité des AChE dans la pathologie MA (73). Des chercheurs ont étudié le transporteur vésiculaire de l'Ach en imagerie TEP (74). Divers traceurs sont disponibles pour étudier que ce soit des marqueurs pré-synaptique ou post-synaptique cholinergiques dans diverses pathologies neurodégénératives (75).

Biomarqueurs de la maladie Alzheimer	Traceurs utilisés pour l'imagerie <i>in vivo</i>	Formule chimique
Neurodégénérescence (perte neuronale)	[¹⁸ F]FDG	
Plaques amyloïdes	[¹¹ C]PiB	¹¹ C-PiB 
	[¹⁸ F]Florbetapir ([¹⁸ F]AV45)	

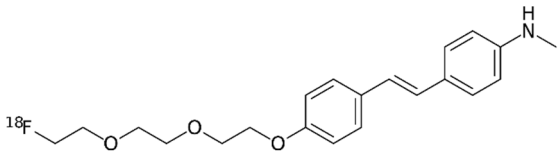
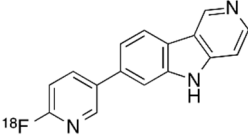
	[¹⁸ F]Florbetaben	
Neurodégénérescence fibrillaires (NFTs)	[¹⁸ F]flortaucipir	
	[¹⁸ F]THK5317	

Figure 51 : Exemples de traceurs TEP utilisés dans la maladie d'Alzheimer.

La biodisponibilité grandissante de divers traceurs TEP (Figure 51) permettant une imagerie *in vivo* non invasive est cruciale pour comprendre l'évolution des maladies neurologiques et l'interconnexion possible de différents marqueurs pathologiques. Cette technique d'imagerie présente un fort potentiel diagnostique et permet ainsi une prise en charge précoce des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elle est également utile pour permettre l'inclusion ou l'exclusion de patients dans divers essais thérapeutiques.

2. Pour tester des approches thérapeutiques

Diverses approches thérapeutiques sont envisagées pour appliquer des interventions visant à modifier, arrêter ou retarder la progression de la maladie et de ses manifestations cliniques. Dans ce cadre, le suivi de l'efficacité thérapeutique par imagerie TEP devient un atout considérable pour la mise en place de thérapies innovantes.

Des stratégies visant les voies de l'agrégation protéique de l'Aβ et de tau ont été développées (76,77). Des études visent également les enzymes responsables du clivage de l'Aβ pour diminuer sa production au niveau cérébral (78). Concernant la protéine tau, des thérapies utilisant des inhibiteurs de la kinase responsable de l'hyperphosphorylation de tau sont en étude (79). Les principales étapes de la voie amyloïde et tau sont soumises à d'intenses recherches pour contrecarrer la genèse des composants neurotoxiques responsables de la modification du fonctionnement cérébral.

Pour suivre leur efficacité, l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP), utilisant des radiotraceurs ciblant l'A β , comme le composé B de Pittsburgh marqué au carbone 11 ($[^{11}\text{C}]\text{PiB}$) ou des analogues fluorés comme le $[^{18}\text{F}]\text{florbetapir}$, a montré de manière convaincante l'efficacité de plusieurs anticorps thérapeutiques pour diminuer la charge en A β dans le cerveau de modèles animaux de la MA et de patients (Figure 52) (80).

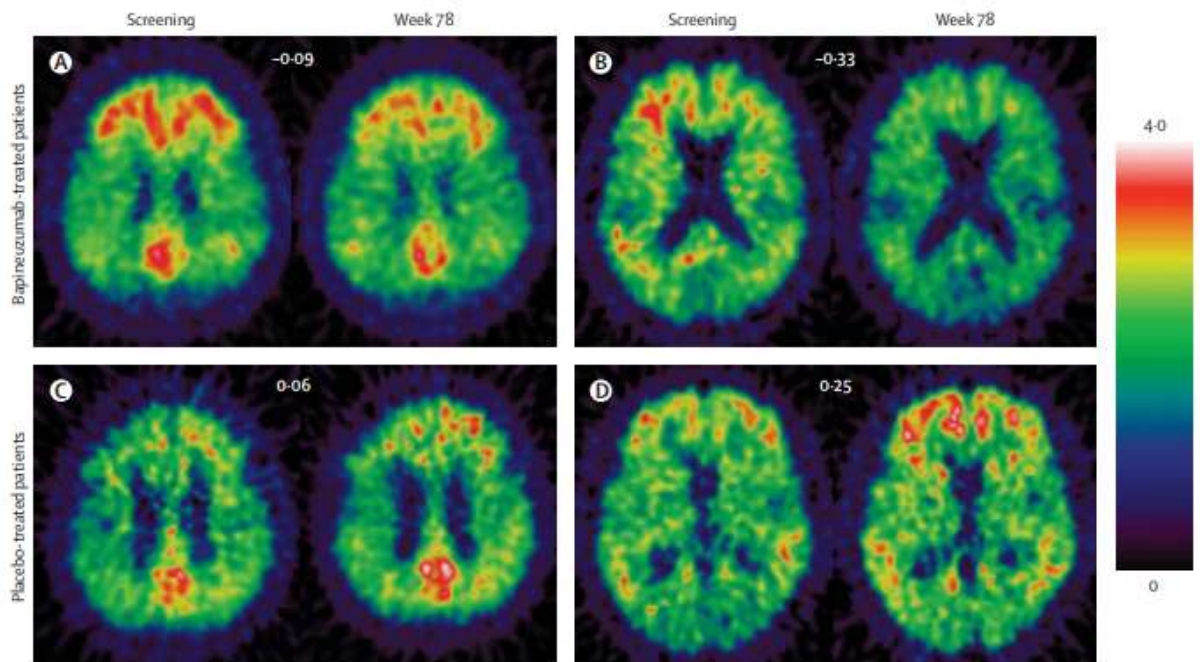


Figure 52: Images TEP du $[^{11}\text{C}]\text{-PiB}$ des patients traités par bapineuzumab ou placebo (D'après Rinne et al, 2010)

Changements entre le début de l'étude et la semaine 78 chez les patients traités par bapineuzumab (A, B) et chez les patients traités par placebo (C, D). Les modifications moyennes de la TEP $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ sont indiquées en haut au centre de chaque panneau pour chaque patient. La barre d'échelle indique les rapports de fixation du PiB par rapport au cervelet. Les scans avant et après le traitement proviennent des images IRM co-registrées dans le même plan.

Cependant, malgré une efficacité évidente au niveau moléculaire, les thérapeutiques ciblant l'amyloïde semblent inefficaces pour retarder les atteintes des performances cognitives chez les patients atteints de MA symptomatique (81).

OBJECTIFS

Dans la présente étude, l'imagerie TEP au 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose([¹⁸F]FDG) va être utilisée comme biomarqueur translationnel de la fonction cérébrale pour la première fois dans un modèle murin d'injection intracérébroventriculaire (i.c.v) d'Aβ₂₅₋₃₅. Cette stratégie d'imagerie *in vivo* va ensuite être appliquée pour étudier l'impact d'un traitement au Donépézil sur le métabolisme cérébral régional. Puis une méthode de cartographie statistique va être utilisée pour une comparaison voxels à voxels des images TEP. La charge amyloïde va être caractérisée en utilisant l'autoradiographie au [¹⁸F]AV45 et l'imagerie par rayons X à contraste de phase dans ce modèle. Ces étapes vont permettre d'évaluer l'impact de la charge amyloïde sur le métabolisme du glucose chez les souris suite à une injection du peptide Aβ₂₅₋₃₅.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Produits chimiques et radiochimiques

Le Donépézil a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Le 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) pour injection a été obtenu auprès de Cyclopharma (Saint-Beauzire, France). Le [¹⁸F]florbetapir ([¹⁸F]AV45) a été radiosynthétisé selon la méthode précédemment décrite (81).

II. Modèle murin de la maladie d'Alzheimer

Toutes les procédures étaient conformes aux directives européennes sur la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire (directive 2010/63/UE du Conseil, décret français 2013-118). Le protocole expérimental a été évalué et validé par un comité d'éthique local pour l'utilisation des animaux et approuvé par le gouvernement français (n° APAFIS#7466-2016110417049220 v3).

Le peptide A β ₂₅₋₃₅ et Sc.A β (peptide contrôle) ont été achetés auprès de Genepep (Saint-Jean-de-Védas, France). Dix-huit souris mâles Swiss âgées de 6 semaines (poids corporel : 30-35 g) ont été anesthésiées à l'isoflurane 2,5 % et ont reçu par voie intracérébroventriculaire (i.c.v) 9 nmol par souris de peptide A β ₂₅₋₃₅ ou des peptides de contrôle (Sc) dans un volume final de 3 μ L, comme décrit précédemment (47). Un minimum de cinq jours a été respecté pour l'acclimatation des souris à notre installation conventionnelle, dans des conditions de température contrôlée (entre 20 et 24°C) et un cycle lumière-obscurité de 12:12 heures. Les souris ont été hébergées par groupe de 5 dans des cages en plexiglas avec un accès ad libitum à l'eau et au régime alimentaire standard et un enrichissement.

III. Traitement au Donépézil

Trois groupes de souris (n=6 par groupe) ont été traités une fois par jour par gavage (5ml/kg) pendant 7 jours. Les groupes ont été définis comme suit : i) Contrôle avec une solution témoin (Ctrl) ; ii) modèle Alzheimer avec une solution témoin (AD) ; iii) modèle Alzheimer avec le Donépézil (0,25mg/kg) (AD-DPZ). La solution témoin était constituée d'H₂O + DMSO 2%.

IV. Acquisition de l'imagerie TEP au [¹⁸F]FDG

La TEP au [¹⁸F]FDG a été réalisée après 7 jours de traitement (soit 10 jours après l'injection du peptide). La dernière dose du traitement a été administrée le matin, 7h avant la TEP. Ensuite, les souris ont été mises à jeun pendant 7 heures avant l'acquisition de la TEP au [¹⁸F]FDG, et seulement l'eau a été accessible pendant ce laps de temps.

Un protocole TEP a été mis au point afin de limiter l'impact de l'anesthésie sur l'estimation de l'absorption cérébrale par TEP du [¹⁸F]-FDG (83). En bref, le [¹⁸F]FDG (0,2 ml ; dose moyenne = 7,19 +/- 0,51MBq) a été injecté par voie intrapéritonéale (i.p.) chez des souris éveillées. Les souris, libres de leurs mouvements, ont ensuite été transférées dans une cage pendant 40 minutes pour permettre l'absorption cérébrale du [¹⁸F]FDG pendant la phase d'éveil. Ensuite, l'anesthésie a été induite en utilisant de l'isoflurane à 2-2,5% dans de l'O₂. Les animaux anesthésiés ont été rapidement transférés sous un scanner microPET, le cerveau se trouvant au milieu du champ de la caméra (Inveon, microPET ; résolution spatiale 1,6 mm ; Siemens Healthcare, Knoxville, TN, USA). Une acquisition TEP statique de 30 minutes a été réalisée 50 minutes après l'injection de [¹⁸F]FDG sous anesthésie maintenue par un masque facial (1,5-2 % isoflurane).

L'acquisition TEP cérébrale statique a été réalisée au plateau de la cinétique cérébrale du [¹⁸F]FDG après l'injection i.p., en supposant que l'impact de l'anesthésie à l'isoflurane sur l'évolution temporelle de l'absorption du [¹⁸F]FDG est limitée (83). A la fin de l'acquisition TEP, toujours sous anesthésie les souris ont été décapitées. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et conservés à -80°C jusqu'aux analyses histologiques ultérieures.

V. Analyse des données TEP au [¹⁸F]FDG

Les images TEP statiques ont été reconstruites par l'algorithme 2D OSEM/FORE et corrigées pour l'atténuation, les coïncidences aléatoires et la diffusion. La taille des voxels était de 0,2 x 0,2 x 0,2 mm³. Les images TEP cérébrales ont été corrigées pour tenir compte de la décroissance radioactive, de la dose injectée et du poids corporel. L'absorption cérébrale du [¹⁸F]FDG a été exprimée en valeurs standard d'absorption, SUV= activité tissulaire (kBq/cc)/[dose injectée (kBq)/poids corporel (g)].

Les images TEP normalisées en SUV ont été spatialement co-registrées sur un modèle TEP standard de souris au [¹⁸F]FDG (84,85) en utilisant le logiciel Pmod (version 3.8, PMOD Technologies Ltd, Zurich, Suisse). Les valeurs SUV ont été déterminées par une analyse en volume d'intérêt dans

des régions cérébrales sélectionnées en fonction de la résolution spatiale du scanner microPET. Les images TEP ont ensuite été normalisées par les valeurs de SUV obtenues dans le cervelet, région de référence en raison de sa faible implication dans la pathologie de la MA (86), afin d'obtenir des valeurs de SUVR dont la variabilité est inférieure à celle du SUV (87). Ensuite, un masque cérébral a été appliqué sur les images TEP normalisées pour ne conserver que les voxels cérébraux.

Une analyse en aveugle a été réalisée pour comparer les données TEP au [^{18}F]FDG entre les groupes. Les valeurs régionales moyennes en SUV et en SUVR dans chaque groupe ont été comparées statistiquement.

Puis, les images paramétriques en SUVR ont été comparées à l'aide du logiciel Statistical Parametric Mapping (SPM8), un test ANOVA à un facteur a été appliqué avec un seuil de significativité de $p < 0,05$ et avec un seuil minimal de 200 voxels, non corrigé pour les comparaisons multiples (88). Ensuite, les cartes paramétriques statistiques ont été superposées au modèle d'IRM de la souris (85) pour visualiser les régions du cerveau affectées par les différences statistiques sur la fixation du [^{18}F]FDG.

VI. Caractérisation de la charge amyloïde dans le modèle *icv* $\text{A}\beta_{25-35}$

1. Autoradiographie au [^{18}F]Florbetapir

La densité des plaques amyloïdes dans le modèle de MA après injection i.c.v. d' $\text{A}\beta_{25-35}$ a été estimée en effectuant une autoradiographie *in vitro* des coupes cérébrales des souris via l'utilisation du radioligand amyloïde [^{18}F]florbetapir. Des coupes de cerveau de 20 μm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050 S). Des tranches de cerveau congelées ont été incubées pendant 30 minutes avec du [^{18}F]florbetapir (1,158 mCi ; RAS : 2112 mCi/ μmol) dilué dans un tampon Tris (50 mM TRIZMA, de Sigma-Aldrich) dans NaCl 0.9% à pH = 7.4. Ensuite, les sections de cerveau ont été placées en contact direct avec un écran Phospho-Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) et exposées pendant 4 heures. Les autoradiogrammes du groupe Ctrl et AD ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ. La fixation du [^{18}F]AV45 a été quantifiée en délimitant le contour de 4 sections cérébrales par animal et ce avec 4 animaux par groupe. La valeur grise moyenne pour chaque ROI normalisé par la surface a été obtenue et comparée entre les groupes ($n=4$

animaux / groupe). La méthode de radiographie a été validée chez le rat TgF344, utilisé comme contrôle positif de l'accumulation cérébrale du dépôt amyloïde (89).

2. Imagerie par rayons X à contraste de phase

L'imagerie par rayons X à contraste de phase utilise la réfraction des rayons X par l'échantillon pour former l'image, contrairement à l'imagerie X conventionnelle qui repose sur l'absorption des rayons X par l'échantillon (**Figure 53**) (90). Grâce à ce type d'imagerie on peut accéder à des détails d'une grande précision présents à l'intérieur de l'échantillon. Cette technique a donc été utilisée pour accéder à la microstructure tissulaire des cerveaux d'Alzheimer et des souris contrôle. Cette méthode a permis de caractériser la charge amyloïde dans ce modèle afin de déterminer si des dépôts amyloïdes sont présents. Cette expérience a été menée par le Dr Fabien Chauveau (Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université de Lyon 1) au Synchrotron SOLEIL (centre français de rayonnement synchrotron).

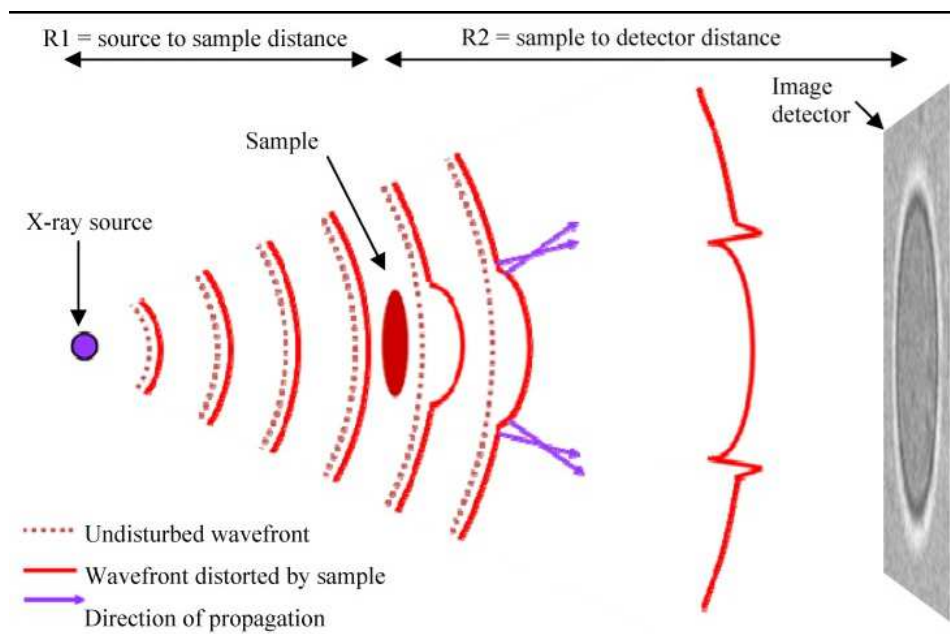


Figure 53: Mécanisme du contraste de phase en ligne. (D'après Mayo et al, 2012)

Mécanisme du contraste de phase en ligne : Un échantillon impose un déphasage au faisceau de rayons X, ce qui déforme le front d'onde des rayons.

VII. Analyse statistique

1. Analyse régionale

Une ANOVA à un facteur a été réalisée pour comparer les valeurs SUV et SUVR entre les groupes pour chaque région du cerveau. Un test t de Student a été réalisé pour comparer les données d'autoradiographie du [¹⁸F]florbetapir chez les animaux contrôle et AD. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad (version 9.0).

2. Approche par cartographie paramétrique statistique

La neuro-imagerie fonctionnelle comme la TEP permet de mesurer la fixation d'un radiotracer en chaque point de l'espace. Les images reconstruites via des algorithmes sont alors constituées d'une multitude de voxels. Chaque voxel représente l'activité d'un volume spécifique dans un espace tridimensionnel cuboïde défini. La cartographie paramétrique statistique (SPM) permet de tester des hypothèses statistiques en chaque point de l'image cérébrale c'est à dire au niveau de chaque voxel. Les différences significatives obtenues entre les groupes peuvent être présentées sous forme de tableau, affichant ainsi les coordonnées des groupements de voxels (clusters) qui présentent une différence significative dans la fixation du radiotracer (augmentation ou diminution). Grâce à ces données on peut alors déterminer les zones cérébrales présentant des différences significatives via l'utilisation d'un atlas. Ces différences statistiques peuvent également être représentées par des zones de couleur superposées sur une référence anatomique cérébrale (ex : modèle IRM), les couleurs représentant l'emplacement des voxels présentant des différences statistiquement significatives entre les conditions. Le gradient de couleur représente les valeurs statistiques. Une carte statistique de la fixation cérébrale du radiotracer est alors générée. L'utilisation de la technique SPM est très utile pour tester différentes hypothèses sur un même set de données.

RÉSULTATS

I. Imagerie TEP cérébrale au [¹⁸F]FDG

Le métabolisme cérébral du glucose a été étudié par TEP au [¹⁸F]FDG. L'analyse quantitative de la fixation du [¹⁸F]FDG a été mesurée à l'aide d'une analyse par volume d'intérêt (VOI) dans des régions cérébrales sélectionnées en fonction de la résolution spatiale du scanner microPET (thalamus, cervelet, tronc cérébral, striatum, hippocampe, hypothalamus, amygdale, cerveau moyen, cortex et cerveau entier) et exprimées en SUV. Aucune différence significative dans la captation du [¹⁸F]FDG n'a été trouvée entre les groupes de souris pour les VOIs sélectionnés ($p > 0,1$) (**Figure 54A**). Même après normalisation des SUV par rapport au cervelet comme région de référence (91), aucune différence significative n'a pu être détectée en utilisant l'approche par VOI ($p > 0,1$) (**Figure 54B**).

Nous avons donc effectué une méthode de cartographie statistique paramétrique (SPM) pour permettre une comparaison par voxel (seuil $p < 0,05$, seuil minimal 200 voxels) sans a priori régional. En utilisant cette approche SPM, on a d'abord observé que la fixation du [¹⁸F]FDG était significativement réduite dans le groupe AD par rapport aux souris Ctrl. La localisation de ce cluster de voxels dans l'hémisphère droit cérébral de la souris, au niveau de la zone sous-corticale, est cohérent avec l'injection i.c.v. unilatérale du peptide A β_{25-35} (**Figure 55A**).

Le même volume cérébral a été associé à une augmentation significative de la fixation du [¹⁸F]FDG chez les souris MA traitées par le Donépézil, par rapport aux souris MA non traitées (**Figure 55B**). De même, la fixation du [¹⁸F]FDG chez les souris atteintes de la maladie d'Alzheimer traitées par le Donépézil n'était pas significativement différente de celle observée dans le groupe Ctrl, ce qui suggère que la perte locale du métabolisme cérébral du glucose a été restaurée par le Donépézil (**Figure 55C**).

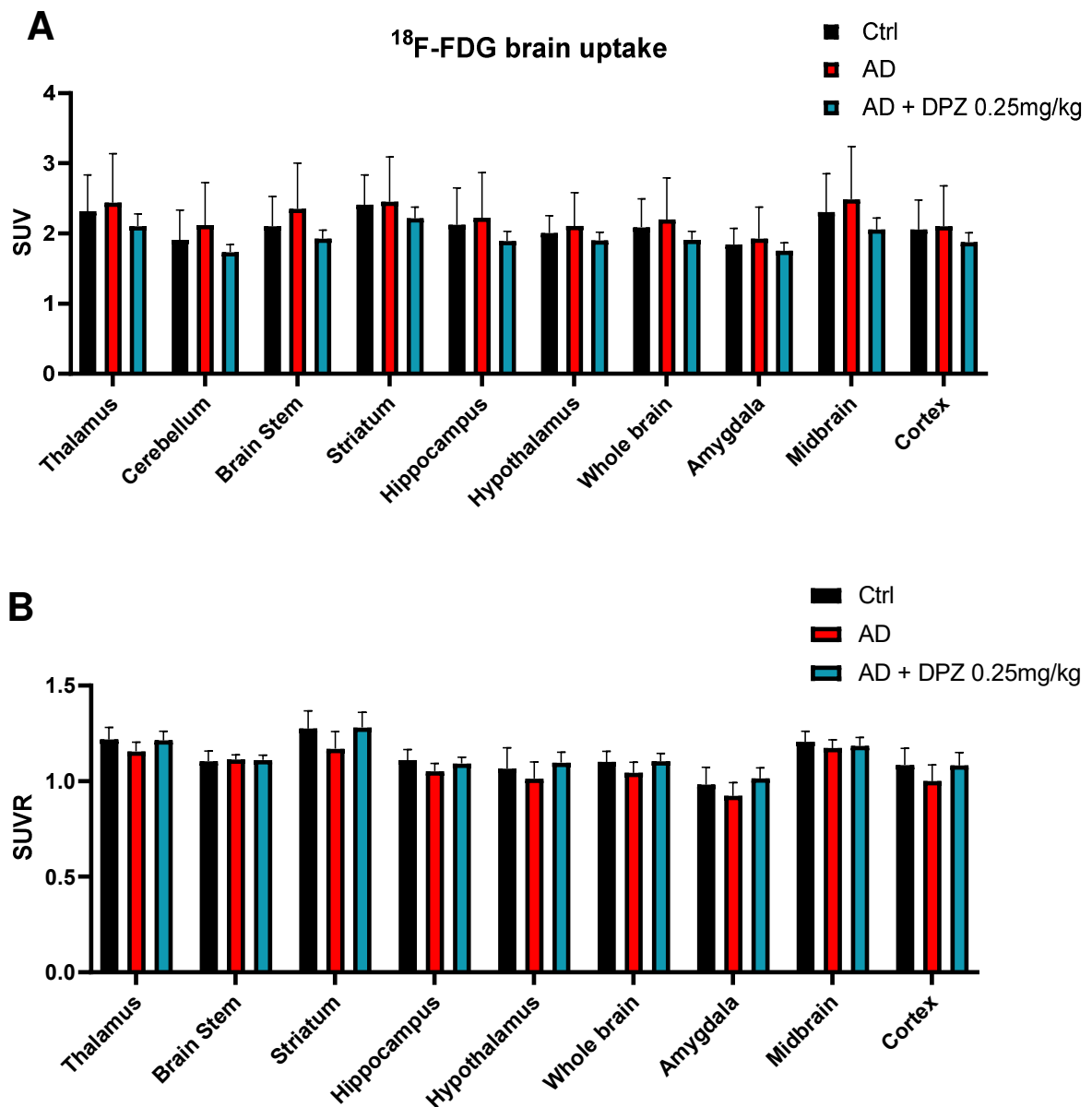


Figure 54: Fixation du [¹⁸F]FDG via une analyse par volume d'intérêt (Voi) chez les souris.

Les groupes de souris Ctrl, AD et AD + DPZ ont été comparés en utilisant une analyse régionale (VOIs). Les données sont exprimées en moyenne + écart-type. Il n'y a pas de différences statistiques sur les valeurs SUV ou les valeurs SUV normalisées par le cervelet (SUVr) entre les groupes ($p > 0,1$).

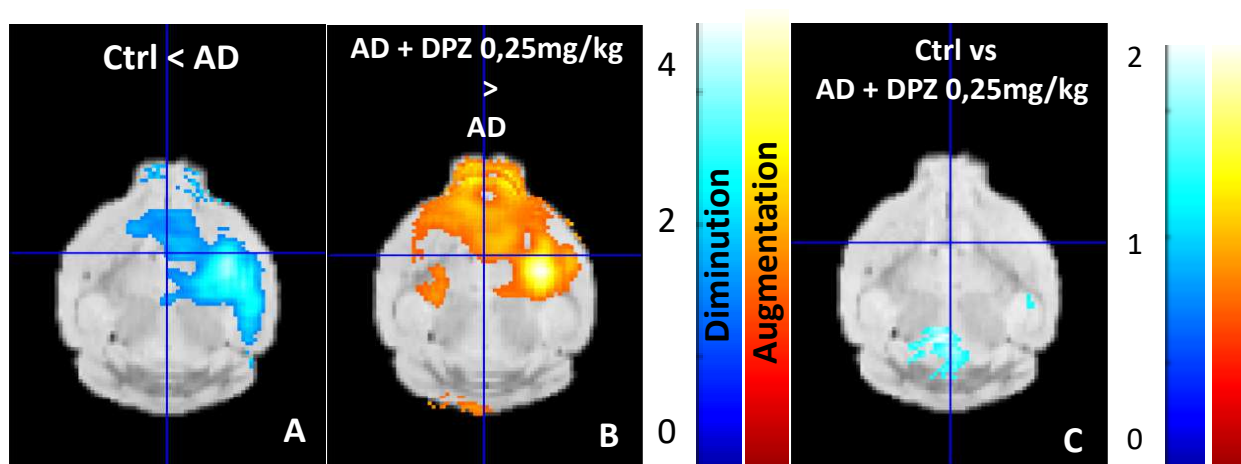


Figure 55: Capture cérébrale du [^{18}F]FDG reflétant la réponse thérapeutique au Donépézil (DPZ).

Toutes les images en valeur standard d'absorption (SUV) ont été normalisées par rapport au cervelet et une analyse statistique paramétrique (SPM8) a été réalisée pour comparer la réponse thérapeutique du Donépézil (DPZ). La carte statistique a été superposée à un modèle standard IRM chez la souris. A) Comparaison entre le groupe Ctrl et le groupe AD. Diminution significative du métabolisme du glucose dans le cerveau après l'induction de la maladie d'Alzheimer (AD) par une injection intracérébroventriculaire unilatérale du peptide $\text{A}\beta_{25-35}$. (valeur $p < 0,05$; seuil : 200 voxels). B) Augmentation significative du métabolisme du glucose dans le cerveau après un traitement par DPZ (0,25mg/kg) chez des souris présentant une pathologie AD. (valeur $p < 0,05$; seuil : 200 voxels). C) Aucune différence significative observée dans l'hémisphère droit entre les souris Ctrl et AD traitées par DPZ (0,25 mg/kg).

II. Charge amyloïde

1. Autoradiographie au [^{18}F]florbetapir

La charge amyloïde putative associée à l'injection *i.c.v.* du peptide $\text{A}\beta_{25-35}$ a été étudiée par autoradiographie avec le radioligand amyloïde [^{18}F]florbetapir. Une liaison plus élevée a été trouvée dans les régions cérébrales contenant de la matière blanche (corps calleux...) par rapport aux régions riches en matière grise, ces observations sont en adéquation avec la liaison cérébrale du [^{18}F]florbetapir (92) (**Figure 56A**). Les différences de fixation du [^{18}F]florbétapir n'ont pas pu être observées visuellement que ce soit au niveau de l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche des souris AD, ni entre les cerveaux des animaux du groupe AD et ceux du groupe Ctrl. La quantification a confirmé ces observations et aucune différence significative n'a pu être observée dans la radioactivité mesurée dans l'hémisphère droit des souris AD par rapport à l'hémisphère gauche ou au cerveau des souris Ctrl ($p > 0.1$) (**Figure 56B**).

La sensibilité de notre méthode autoradiographie a été validée sur des coupes cérébrales de rat TgF344, utilisées comme témoins positifs. Les données autoradiographiques ont confirmé la présence de plaques amyloïdes après leur incubation avec le [¹⁸F]AV45. Dans le cerveau de rat atteint de la maladie d'Alzheimer, on a constaté une forte liaison du radiotracer aux régions corticales et hippocampiques, reflétant la présence de plaques d'Aβ (Figure 57).

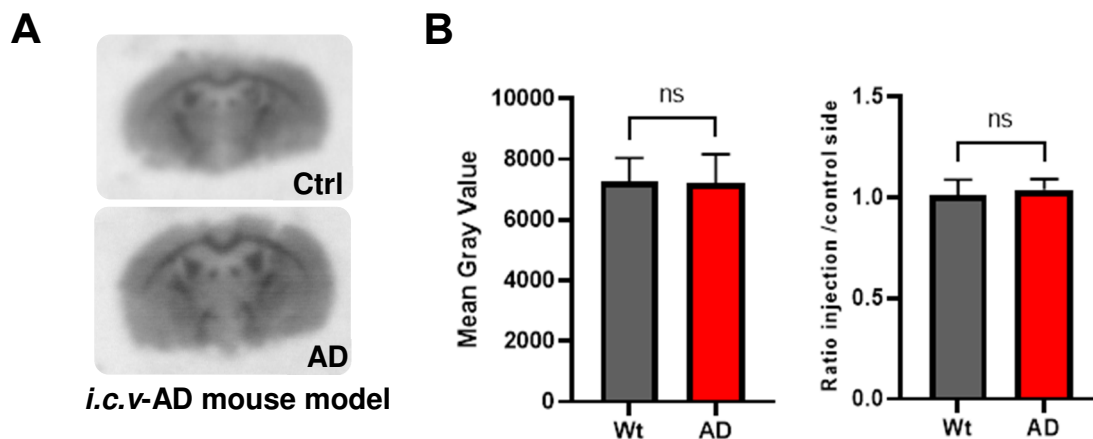


Figure 56: Autoradiographie avec le [¹⁸F]AV45 sur le modèle icv d'Aβ₂₅₋₃₅

A) Coupes de cerveau de souris représentatives de la fixation de 18F-AV45 dans l'hippocampe et la région corticale. B) Analyse quantitative in vitro de la fixation du 18F-AV45 sur les autoradiogrammes dans le modèle de souris i.c.v Aβ₂₅₋₃₅ (n=4 animaux par groupe avec 4 sections de cerveau quantifiées par animal). La valeur grise moyenne normalisée par la surface du ROI est présentée sur le premier graphique. Le rapport [¹⁸F]AV45 entre le côté injection et le côté contrôle a également été mesuré. Dans ces 2 conditions, il n'y avait pas de différences significatives dans la fixation in vitro du [¹⁸F]AV45 entre le groupe Ctrl et le groupe AD (p>0,1).

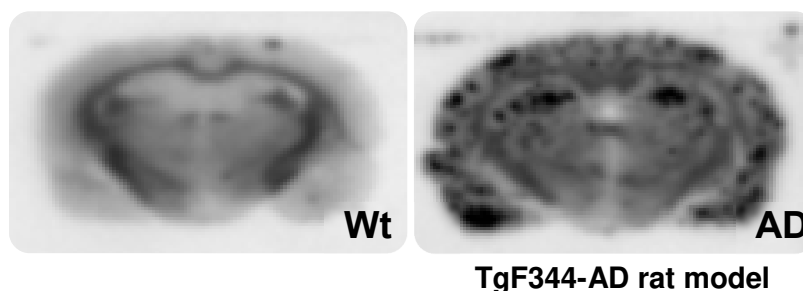


Figure 57: Autoradiographie in vitro avec le [¹⁸F]AV45 sur un modèle rat Alzheimer (TgF344).

Coupes cérébrales représentatives de la fixation du [¹⁸F]AV45 sur un modèle transgénique rat Alzheimer et un rat wt comme contrôle. Une accumulation du radiotracer est observée dans la région corticale et hippocampique chez le rat Tg-344 non observable chez le rat Wt.

2. Imagerie par rayons X à contraste de phase

La technique d'imagerie par rayons X à contraste de phase a permis de visualiser la charge amyloïde chez une souris suite à l'injection du peptide $A\beta_{25-35}$ et de comparer ces observations avec une souris Ctrl. Aucune différence visuelle n'a été observée entre la souris AD et la souris Ctrl (**Figure 58**).

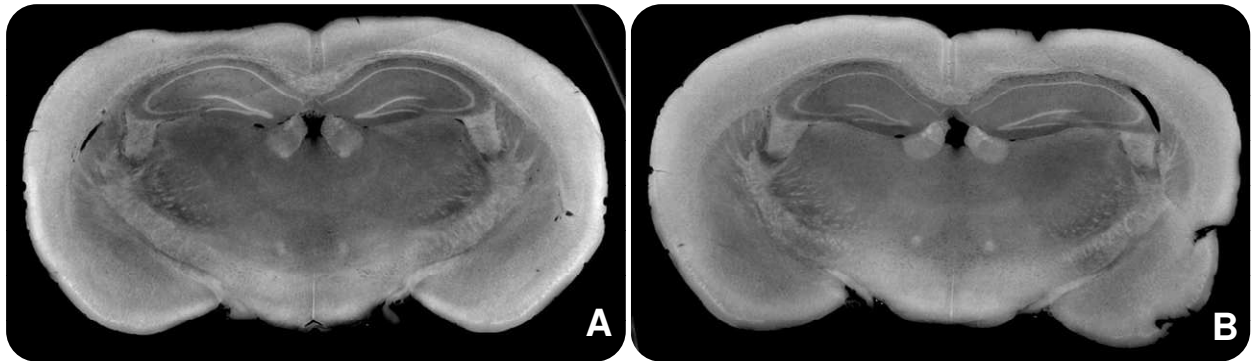


Figure 58: Imagerie par rayons X à contraste de phase pour caractériser la charge amyloïde dans le modèle murin icv $A\beta_{25-35}$.

A) Ctrl-group (n=1). B) AD-group (n=1). Aucune différence visuelle n'a été observée entre le groupe Ctrl et AD.

DISCUSSION

Dans la présente étude, le déclin régional de la fonction cérébrale associé à l'injection *i.c.v.* de peptide A β_{25-35} a été évalué à l'aide d'une imagerie TEP au [^{18}F]FDG non invasive. La diminution locale du métabolisme cérébral du glucose était significative dans la zone entourant l'injection unilatérale d'A β_{25-35} et n'était pas associée à la présence de plaques amyloïdes détectables. Il est intéressant de noter que le métabolisme cérébral a été restauré grâce à un traitement par une dose thérapeutique de Donépézil, un inhibiteur de l'AChE.

La TEP au [^{18}F]FDG est couramment réalisée en milieu hospitalier comme biomarqueur de la neurodégénérescence dans la MA (93). La TEP au [^{18}F]FDG fait partie de la classification selon les stades d'évolution de la MA. Chez les patients atteints de MCI et de MA, une diminution précoce de la captation du [^{18}F]FDG est observée dans les zones temporales du cerveau associées aux processus de mémoire (hippocampe) (93–95). Aux stades plus avancés de la maladie, la baisse du métabolisme du glucose atteint les zones corticales, en particulier le cortex frontal. Certaines régions du cerveau sont épargnées par la réduction de la consommation de glucose, comme le cortex visuel et moteur primaire ainsi que le cervelet.

Malgré les observations cliniques suggérant une diminution de la consommation de glucose chez les patients atteints de la MA, les études précliniques utilisant des modèles murins de la maladie d'Alzheimer restent contradictoires. En effet, la consommation de glucose était supérieure, inchangée ou inférieure selon le modèle de souris et la méthode de quantification utilisée (96). De plus, toutes les études précliniques utilisant le cervelet comme région de référence avaient montré une augmentation de la consommation de glucose (91,97,98), ce qui est en contradiction avec les observations cliniques que ce soit aux stades précoces ou avancés de la maladie d'Alzheimer. Il est intéressant de noter que dans ce modèle *i.c.v.*, l'utilisation du cervelet pour normaliser les images TEP a montré une diminution du métabolisme cérébral du glucose en accord avec les investigations cliniques.

Il est intéressant de noter que l'altération du métabolisme du glucose dans le SNC précéderait l'apparition de la pathologie amyloïde et le développement des processus neurodégénératifs (99). Aucune corrélation n'a été trouvée entre la diminution de la fixation du [^{18}F]FDG et la charge amyloïde dans les régions du cerveau (97). La fixation du [^{18}F]AV45 *ex vivo* n'était pas corrélée à la consommation de glucose (100).

Ces observations cliniques sont cohérentes avec nos données TEP au [¹⁸F]FDG montrant un déclin du métabolisme du glucose associé à l'injection du peptide Aβ₂₅₋₃₅ chez la souris, sans augmentation détectable de la charge amyloïde. Dans ce modèle *i.c.v.*, la détection de formes fibrillaires du peptide Aβ₂₅₋₃₅ similaires aux dépôts amyloïdes des plaques séniles a été mise en évidence par coloration au rouge congo (47). Dans le modèle rat de l'Aβ₂₅₋₃₅, des expériences utilisant la microscopie électronique, la spectroscopie infrarouge et la coloration au rouge congo ont validé l'agrégation du peptide Aβ₂₅₋₃₅ en fibrilles amyloïdes (101). Nos résultats autoradiographiques et par imagerie par rayons X à contraste de phase vont dans le même sens et ne démontrent pas la présence de plaques amyloïdes suite à l'injection du peptide Aβ₂₅₋₃₅. Une étude par imagerie à rayons X à contraste de phase a été utilisée dans des modèles murins transgéniques de la MA et démontre clairement l'utilité de cette technique d'imagerie pour l'étude des plaques amyloïdes (102). Ces résultats montrent que dans notre étude, une altération de la consommation de glucose est détectable en l'absence de plaques amyloïdes. Ces observations suggèrent que la toxicité neuronale directe engendrée par les oligomères d'Aβ₂₅₋₃₅ a un impact sur la fonction cérébrale bien avant la formation de plaques amyloïdes. Il a été montré que les associations du peptide Aβ₂₅₋₃₅ étaient très dynamiques et que les protofibrilles seraient aptes à redonner des formes oligomériques solubles toxiques (103), un processus pouvant souligner l'absence de plaques observables dans notre étude.

Au-delà de l'utilisation diagnostique, la TEP au [¹⁸F]FDG constitue un biomarqueur d'activité neuronale pratique pour la neuroimagerie fonctionnelle (104). Nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité des traitements symptomatiques de la MA pourrait être évalué par la TEP au [¹⁸F]FDG (88). Une procédure d'acquisition optimisée a été réalisée afin de limiter l'impact de l'anesthésie sur la fonction et le métabolisme du cerveau. Nous avons tiré parti de l'absorption peu réversible du [¹⁸F]FDG dans les cellules du cerveau, qui entraîne un plateau dans la cinétique cérébrale de la radioactivité. Des études antérieures ont montré que la captation cérébrale du [¹⁸F]FDG n'est pas affectée par l'anesthésie lorsque l'acquisition TEP commence 40 minutes après l'injection *i.v.* de [¹⁸F]FDG, atteignant des niveaux similaires à la captation cérébrale mesurée chez des rats conscients (non anesthésiés) (52). Le [¹⁸F]FDG a été injecté par voie *i.p.* afin de limiter l'impact du stress induit par les manipulations sur les fonctions cérébrales des animaux éveillés (105). L'évolution de la cinétique cérébrale du [¹⁸F]FDG après administration *i.p.* a été évaluée chez des souris anesthésiées afin de définir le temps d'acquisition optimal. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une augmentation de la fixation cérébrale du [¹⁸F]FDG a été signalée après l'administration de Donépézil (3 mg/jour pendant les deux premières semaines, puis 5 mg/jour si le patient le tolère). Cela met en évidence l'effet du Donépézil sur la fonction et le métabolisme

cérébraux des patients (106). Dans notre étude, l'administration chronique d'une dose thérapeutique de Donépézil (0,25mg/kg par jour) a été testée chez des souris atteintes de la maladie d'Alzheimer. Il est intéressant de noter que l'augmentation du métabolisme cérébral induite par le Donépézil était ciblée sur la région où la fonction du [¹⁸F]FDG était réduite par rapport aux souris de type sauvage. Cela suggère que le Donépézil agit de préférence pour restaurer le métabolisme du glucose altéré par la toxicité de l'Aβ₂₅₋₃₅ plutôt que pour améliorer la fonction cérébrale globale. En effet, aucune augmentation du métabolisme cérébral n'a été observée chez les souris MA traitées par le Donépézil par rapport aux souris de type sauvage. Le modèle de MA par injection *i.c.v.* d'Aβ₂₅₋₃₅ présente des troubles de la mémoire bien caractérisés (47,107). Nos résultats suggèrent que la captation cérébrale de [¹⁸F]FDG peut suivre quantitativement la perte fonctionnelle dans le déclin de l'activité neuronale.

D'autres techniques d'imagerie pharmacologique telles que l'IRM fonctionnelle (IRM pharmacologique) et l'échographie fonctionnelle (pharmaco-FUS) sont en cours de développement pour étudier l'impact sur le SNC des thérapies mécanistiques et non mécanistiques dans la MA (108). Ce travail illustre la valeur ajoutée de la TEP au [¹⁸F]FDG qui peut être réalisée comme une alternative peu invasive et translationnelle pour limiter l'impact de l'anesthésie sur l'estimation des effets des médicaments étudiés dans les régions cérébrales.

CONCLUSION

Au-delà de la caractérisation comportementale avec des pertes cognitives et mnésiques bien décrites, le modèle de MA par injection *i.c.v.* d'A β_{25-35} chez la souris récapitule la diminution du métabolisme cérébral du glucose observée chez les patients sans formation de plaques amyloïdes détectables. Le métabolisme normal du glucose a été restauré par le Donépézil. La TEP au [^{18}F]FDG du cerveau dans ce modèle de souris constitue donc une méthode pratique pour étudier l'impact des traitements de la MA sur la perte de la fonction neuronale, indépendamment de leur mécanisme pharmacologique.

RÉFÉRENCES

1. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M. World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. 2015.
2. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis.* 29 févr 2020;12:1179573520907397.
3. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging–Alzheimer’s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* janv 2012;8(1):1-13.
4. Grimmer T, Licata A. Functional Decline in Alzheimer’s Disease: A Continuum. *J Am Geriatr Soc.* 2018;66(12):2239-40.
5. Vernooij MW, Smits M. Structural neuroimaging in aging and Alzheimer’s disease. *Neuroimaging Clin N Am.* févr 2012;22(1):33-55, vii-viii.
6. Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in « probable » Alzheimer’s disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* oct 1992;55(10):967-72.
7. ten Kate M, Dicks E, Visser PJ, van der Flier WM, Teunissen CE, Barkhof F, et al. Atrophy subtypes in prodromal Alzheimer’s disease are associated with cognitive decline. *Brain.* déc 2018;141(12):3443-56.
8. Bayer TA. Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol.* mai 2015;25(5):713-24.
9. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 mai 1984;120(3):885-90.
10. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1985;82(12):4245-9.
11. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer’s disease. *Nat Rev Neurosci.* juill 2007;8(7):499-509.
12. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med Berl Ger.* nov 2003;81(11):678-99.
13. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem.* 20 juin 2017;86:27-68.
14. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 10 avr 1992;256(5054):184-5.
15. Serrano-Pozo A, Qian J, Muzikansky A, Monsell SE, Montine TJ, Frosch MP, et al. Thal Amyloid Stages Do Not Significantly Impact the Correlation Between Neuropathological Change and Cognition in the Alzheimer Disease Continuum. *J Neuropathol Exp Neurol.* juin 2016;75(6):516-26.
16. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2007;8(2):101-12.
17. Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 22 mars 2000;283(12):1571-7.

18. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* déc 1999;46(6):860-6.
19. Kirkitadze MD, Bitan G, Teplow DB. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res.* 1 sept 2002;69(5):567-77.
20. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 25 juin 2002;58(12):1791-800.
21. Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1986;83(11):4040-3.
22. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1975;72(5):1858-62.
23. Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T, et al. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 29 juin 2018;6:52.
24. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 1 juin 1993;10(6):1089-99.
25. Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow E-M. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol Zurich Switz.* janv 2007;17(1):83-90.
26. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol (Berl).* 2006;112(4):389-404.
27. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* mai 2012;71(5):362-81.
28. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 14 sept 1984;225(4667):1168-70.
29. Nebes RD. Semantic memory in Alzheimer's disease. *Psychol Bull.* nov 1989;106(3):377-94.
30. Lafleche G, Albert MS. Executive function deficits in mild Alzheimer's disease. *Neuropsychology.* 1995;9(3):313-20.
31. Braak H, Del Tredici K. Evolutional Aspects of Alzheimer's Disease Pathogenesis. Perry G, Zhu X, Smith MA, Sorensen A, Avila J, éditeurs. *J Alzheimers Dis.* 27 déc 2012;33(s1):S155-61.
32. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* juill 2009;11(7):909-13.
33. Baker HF, Ridley RM, Duchon LW, Crow TJ, Bruton CJ. Evidence for the experimental transmission of cerebral beta-amyloidosis to primates. *Int J Exp Pathol.* oct 1993;74(5):441-54.
34. Duyckaerts C, Clavaguera F, Potier M-C. The prion-like propagation hypothesis in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* avr 2019;32(2):266-71.
35. Hadi Alijanvand S, Peduzzo A, Buell AK. Secondary Nucleation and the Conservation of Structural Characteristics of Amyloid Fibril Strains. *Front Mol Biosci.* 2021;8:669994.

36. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 5 sept 2013;501(7465):45-51.
37. Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM. The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. *Neurobiol Aging*. oct 1992;13(5):553-9.
38. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 5 mars 1982;215(4537):1237-9.
39. Cantero JL, Atienza M, Lage C, Zaborszky L, Vilaplana E, Lopez-Garcia S, et al. Atrophy of Basal Forebrain Initiates with Tau Pathology in Individuals at Risk for Alzheimer's Disease. *Cereb Cortex N Y N* 1991. 14 avr 2020;30(4):2083-98.
40. Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain J Neurol*. sept 1976;99(3):459-96.
41. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J*. 25 nov 1978;2(6150):1457-9.
42. Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol*. févr 1974;30(2):113-21.
43. Schröder H, Giacobini E, Struble RG, Zilles K, Maelicke A. Nicotinic cholinergic neurons of the frontal cortex are reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. juin 1991;12(3):259-62.
44. Francis PT, Ramírez MJ, Lai MK. Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. oct 2010;59(4-5):221-9.
45. Potter PE, Rauschkolb PK, Pandya Y, Sue LI, Sabbagh MN, Walker DG, et al. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. juill 2011;122(1):49-60.
46. Knowles J. Donepezil in Alzheimer's disease: an evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evid*. 2006;1(3):195-219.
47. Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*. 15 janv 1996;706(2):181-93.
48. Meunier J, Ieni J, Maurice T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β 25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ 1 receptor. *Br J Pharmacol*. déc 2006;149(8):998-1012.
49. Cummings J, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Taghva K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv*. 25 mai 2021;7(1):e12179.
50. Götz J, Bodea L-G, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. oct 2018;19(10):583-98.
51. Borsook D, Becerra L, Fava M. Use of functional imaging across clinical phases in CNS drug development. *Transl Psychiatry*. juill 2013;3(7):e282.
52. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, et al. The [14 C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*. mai 1977;28(5):897-916.
53. Ishibashi K, Onishi A, Wagatsuma K, Fujiwara Y, Ishii K. Longitudinal 18 F-FDG Images in Patients With Alzheimer Disease Over More Than 9 Years From a Preclinical Stage. *Clin Nucl Med*. 1 févr 2020;45:1.

54. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* avr 2018;14(4):535-62.
55. Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W, et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA.* 7 nov 2001;286(17):2120-7.
56. Morbelli S, Bauckneht M, Arnaldi D, Picco A, Pardini M, Brugnolo A, et al. 18F-FDG PET diagnostic and prognostic patterns do not overlap in Alzheimer's disease (AD) patients at the mild cognitive impairment (MCI) stage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* nov 2017;44(12):2073-83.
57. Anchisi D, Borroni B, Franceschi M, Kerrouche N, Kalbe E, Beuthien-Beumann B, et al. Heterogeneity of brain glucose metabolism in mild cognitive impairment and clinical progression to Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005;
58. Rice L, Bisdas S. The diagnostic value of FDG and amyloid PET in Alzheimer's disease-A systematic review. *Eur J Radiol.* sept 2017;94:16-24.
59. Grothe MJ, Barthel H, Sepulcre J, Dyrba M, Sabri O, Teipel SJ, et al. In vivo staging of regional amyloid deposition. *Neurology.* 14 nov 2017;89(20):2031-8.
60. Chen S-D, Lu J-Y, Li H-Q, Yang Y-X, Jiang J-H, Cui M, et al. Staging tau pathology with tau PET in Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Transl Psychiatry.* 18 sept 2021;11(1):1-12.
61. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* mars 2004;55(3):306-19.
62. Price JC, Klunk WE, Lopresti BJ, Lu X, Hoge JA, Ziolkowski SK, et al. Kinetic modeling of amyloid binding in humans using PET imaging and Pittsburgh Compound-B. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* nov 2005;25(11):1528-47.
63. Clark CM, Pontecorvo MJ, Beach TG, Bedell BJ, Coleman RE, Doraiswamy PM, et al. Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid- β plaques: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* août 2012;11(8):669-78.
64. Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, Beach TG, Bilker WB, Mintun MA, et al. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA.* 19 janv 2011;305(3):275-83.
65. Saint-Aubert L, Lemoine L, Chiotis K, Leuzy A, Rodriguez-Vieitez E, Nordberg A. Tau PET imaging: present and future directions. *Mol Neurodegener.* 20 févr 2017;12:19.
66. Schonhaut DR, McMillan CT, Spina S, Dickerson BC, Siderowf A, Devous MD, et al. 18 F-flortaucipir tau positron emission tomography distinguishes established progressive supranuclear palsy from controls and Parkinson disease: A multicenter study. *Ann Neurol.* oct 2017;82(4):622-34.
67. Xia C, Makaretz SJ, Caso C, McGinnis S, Gomperts SN, Sepulcre J, et al. Association of In Vivo [18F]AV-1451 Tau PET Imaging Results With Cortical Atrophy and Symptoms in Typical and Atypical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 1 avr 2017;74(4):427-36.
68. Chiotis K, Savitcheva I, Poulakis K, Saint-Aubert L, Wall A, Antoni G, et al. [18F]THK5317 imaging as a tool for predicting prospective cognitive decline in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 3 juill 2020;
69. Smith R, Wibom M, Pawlik D, Englund E, Hansson O. Correlation of In Vivo [18F]Flortaucipir With Postmortem Alzheimer Disease Tau Pathology. *JAMA Neurol.* mars 2019;76(3):310-7.

70. Kilbourn MR, Snyder SE, Sherman PS, Kuhl DE. In vivo studies of acetylcholinesterase activity using a labeled substrate, N-[11C]methylpiperidin-4-yl propionate ([11C]PMP). *Synap N Y N*. févr 1996;22(2):123-31.
71. Leung K. 1-[11C]Methylpiperidin-4-yl propionate. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004 [cité 2 oct 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23068/>
72. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, et al. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 10 mars 1999;52(4):691-9.
73. Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, et al. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol*. déc 2003;60(12):1745-8.
74. Schmitz T, Mur M, Aghourian M, Bedard MA, et al. Longitudinal Alzheimer's Degeneration Reflects the Spatial Topography of Cholinergic Basal Forebrain Projections. 2018, *Cell Reports* 24, 38–46
75. Roy R, Niccolini F, Pagano G, Politis M. Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. juill 2016;43(7):1376-86.
76. Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 22 août 2007;27(34):9115-29.
77. Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, et al. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*. avr 2010;9(4):363-72.
78. Barthel H, Seibyl J, Sabri O. The role of positron emission tomography imaging in understanding Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. avr 2015;15(4):395-406.
79. Maqbool M, Mobashir M, Hoda N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 1 janv 2016;107:63-81.
80. Declercq LD, Vandenberghe R, Van Laere K, Verbruggen A, Bormans G. Drug Development in Alzheimer's Disease: The Contribution of PET and SPECT. *Front Pharmacol*. 31 mars 2016;7:88.
81. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 3 oct 2019;179(2):312-39.
82. Liu Y, Zhu L, Plössl K, Choi SR, Qiao H, Sun X, et al. Optimization of automated radiosynthesis of [18F]AV-45: a new PET imaging agent for Alzheimer's disease. *Nucl Med Biol*. nov 2010;37(8):917-25.
83. Toyama H, Ichise M, Liow JS, Vines DC, Seneca NM, Modell KJ, et al. Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. *Nucl Med Biol*. févr 2004;31(2):251-6.
84. Mirrione MM, Schiffer WK, Fowler JS, Alexoff DL, Dewey SL, Tsirka SE. A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator. *NeuroImage*. 15 oct 2007;38(1):34-42.
85. Ma Y, Hof PR, Grant SC, Blackband SJ, Bennett R, Slatest L, et al. A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6j mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience*. 1 janv 2005;135(4):1203-15.
86. Talbot PR, Lloyd JJ, Snowden JS, Neary D, Testa HJ. Choice of reference region in the quantification of single-photon emission tomography in primary degenerative dementia. *Eur J Nucl Med*. juin 1994;21(6):503-8.

87. Goutal S, Tournier N, Guillemier M, Van Camp N, Barret O, Gaudin M, et al. Comparative test-retest variability of outcome parameters derived from brain [18F]FDG PET studies in non-human primates. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240228.
88. Vodovar D, Duchêne A, Wimberley C, Leroy C, Pottier G, Dauvilliers Y, et al. Cortico-Amygdala-Striatal Activation by Modafinil/Flecainide Combination. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1 juill 2018;21(7):687-96.
89. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $\alpha\beta$, and frank neuronal loss. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 10 avr 2013;33(15):6245-56.
90. Mayo SC, Stevenson AW, Wilkins SW. In-Line Phase-Contrast X-ray Imaging and Tomography for Materials Science. *Mater Basel Switz*. 24 mai 2012;5(5):937-65.
91. Brendel M, Probst F, Jaworska A, Overhoff F, Korzhova V, Albert NL, et al. Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. juin 2016;57(6):954-60.
92. Auvity S, Tonietto M, Caillé F, Bodini B, Bottlaender M, Tournier N, et al. Repurposing radiotracers for myelin imaging: a study comparing 18F-florbetaben, 18F-florbetapir, 18F-flutemetamol, 11C-MeDAS, and 11C-PiB. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. févr 2020;47(2):490-501.
93. Silverman DHS, Small GW, Phelps ME. Clinical Value of Neuroimaging in the Diagnosis of Dementia. Sensitivity and Specificity of Regional Cerebral Metabolic and Other Parameters for Early Identification of Alzheimer's Disease. *Clin Positron Imaging Off J Inst Clin PET*. mai 1999;2(3):119-30.
94. Mosconi L, Tsui W-H, De Santi S, Li J, Rusinek H, Convit A, et al. Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology*. 14 juin 2005;64(11):1860-7.
95. Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. avr 2005;32(4):486-510.
96. Bouter C, Bouter Y. 18F-FDG-PET in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Med*. 2019;6:71.
97. Waldron A-M, Wintolders C, Bottelbergs A, Kelley JB, Schmidt ME, Stroobants S, et al. In vivo molecular neuroimaging of glucose utilization and its association with fibrillar amyloid- β load in aged APPPS1-21 mice. *Alzheimers Res Ther*. 15 déc 2015;7(1):76.
98. Poisnel G, Hérard A-S, El Tannir El Tayara N, Bourrin E, Volk A, Kober F, et al. Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. sept 2012;33(9):1995-2005.
99. Foster NL, Wang AY, Tasdizen T, Fletcher PT, Hoffman JM, Koeppe RA. Realizing the potential of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose to improve the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. janv 2008;4(1 Suppl 1):S29-36.
100. Waldron A-M, Wyffels L, Verhaeghe J, Richardson JC, Schmidt M, Stroobants S, et al. Longitudinal Characterization of [18F]-FDG and [18F]-AV45 Uptake in the Double Transgenic TASTPM Mouse Model. *J Alzheimers Dis JAD*. 2017;55(4):1537-48.
101. Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, et al. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *Am J Pathol*. juill 2011;179(1):315-34.
102. Chourrout M, Roux M, Boisvert C, Gislard C, et al. Brain virtual histology with X-ray phase-contrast tomography Part II: 3D morphologies of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease models. *Biomedical Optics Express*. 2022.

103. Labbé J-F, Lefèvre T, Guay-Bégin A-A, Auger M. Structure and membrane interactions of the β -amyloid fragment 25-35 as viewed using spectroscopic approaches. *Phys Chem Chem Phys PCCP*. 21 mai 2013;15(19):7228-39.
104. Varrone A, Asenbaum S, Vander Borght T, Booij J, Nobili F, Någren K, et al. EANM procedure guidelines for PET brain imaging using [^{18}F]FDG, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. déc 2009;36(12):2103-10.
105. Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, et al. Impact of animal handling on the results of ^{18}F -FDG PET studies in mice. *J Nucl Med*. 1 juin 2006;47(6):999-1006.
106. Shimada A, Hashimoto H, Kawabe J, Higashiyama S, Kai T, Kataoka K, et al. Evaluation of therapeutic response to donepezil by positron emission tomography. *Osaka City Med J*. juin 2011;57(1):11-9.
107. D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- β 25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. juin 2012;37(7):1784-92.
108. Tournier N, Comtat C, Lebon V, Gennisson J-L. Challenges and Perspectives of the Hybridization of PET with Functional MRI or Ultrasound for Neuroimaging. *Neuroscience*. 20 oct 2020;S0306-4522(20)30666-7.

ÉTUDE 3

Imagerie TEP avec le [^{18}F]-2- fluoro-2-désoxy-sorbitol ([^{18}F]FDS) pour la détermination quantitative de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique induite par les ultrasons focalisés transcrâniens.

INTRODUCTION

I. Altérations pathologiques de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) isole et protège le cerveau de la circulation sanguine systémique grâce à son étanchéité permettant ainsi de contrôler avec précision les substances pouvant pénétrer au sein du SNC en conditions physiologiques (1). L'intégrité de la BHE est principalement assurée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales adjacentes formant la microvasculature cérébrale. Cela limite considérablement le passage paracellulaire (c'est-à-dire entre les cellules) des solutés à travers la BHE, ce qui contribue à maintenir le sanctuaire cérébral intact (1). Cependant, un grand nombre de recherches translationnelles montre que l'intégrité de la BHE est compromise dans de nombreuses pathologies du SNC, notamment la sclérose en plaques, les accidents vasculaires cérébraux hypoxiques/ischémiques, les lésions traumatiques, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, l'épilepsie et les tumeurs cérébrales. Les perturbations de l'intégrité de la BHE peuvent être d'origine multiples, dans la majorité des pathologies précédemment citées, des dérégulations de l'expression de certains transporteurs comme la P-gp ou la modification dont la sous-régulation des protéines des jonctions serrées sont mis en cause (2). En outre, différents modèles précliniques ont montré que la fuite de la BHE est étroitement liée à la cascade neuroinflammatoire (3). Pendant une inflammation systémique, les microglies sont capables de migrer vers les vaisseaux sanguins suite au relargage de molécules chimio attractantes dans le milieu extracellulaire par les cellules endothéliales. Si le processus inflammatoire persiste, les microglies vont changer de morphologie et rentrer en configuration phagocytaire s'attaquant ainsi aux pieds astrocytaires induisant de ce fait des dommages au niveau de la BHE augmentant sa perméabilité (3). Ces preuves expérimentales nous démontrent la dualité du rôle des cellules immunitaires dans la protection du SNC notamment leur contribution à l'exacerbation des lésions cérébrales associées à des maladies neurologiques (3,4). La compréhension de la dynamique de la BHE en conditions pathologiques constitue donc un axe majeur de recherche afin de déterminer de potentielles fenêtres d'intervention thérapeutiques. En effet, de nombreuses molécules médicamenteuses et thérapeutiques ne peuvent pas pénétrer naturellement la BHE afin d'agir au niveau de leurs cibles présentes dans le parenchyme cérébral. Par conséquent, la BHE constitue un rempart dans le développement de médicaments ciblant le SNC, ce qui complique le traitement des maladies du

cerveau, notamment les tumeurs cérébrales malignes (5). Afin d'évaluer l'intégrité de la BHE, des biomarqueurs peuvent être utilisés.

II. Biomarqueurs de l'intégrité de la BHE

Des biomarqueurs avec des caractéristiques précises sont nécessaires pour démontrer quantitativement la perte d'intégrité de la BHE dans diverses conditions pathophysiologiques (6). En effet, leur capacité de fixation à des sites spécifiques au niveau plasmatique ou tissulaire est à éviter, ils ne doivent pas présenter de toxicité et leur visibilité ainsi que leur quantification doit être possible. Le marqueur « idéal » devrait présenter ces multiples particularités. A l'heure actuelle, aucun biomarqueur ne regroupe ces qualités malgré les efforts et les avancées effectués dans le domaine afin de trouver un marqueur à forte valeur ajoutée pour la détection des perturbations de la BHE.

Dans les recherches précliniques *in vitro* et *ex vivo*, des molécules de faible poids moléculaire (MW, g/mol) et hydrophiles telles que la fluorescéine (MW=332, détection par fluorescence), des analogues (radio)marqués du saccharose (MW=342) ou du mannitol (MW=182) sont préférentiellement utilisés comme marqueurs quantitatifs "paracellulaires" (c'est-à-dire entre les cellules) de l'intégrité des membranes (2,7).

Un faible MW est associé à une sensibilité accrue suite à un changement subtil de la perméabilité de la barrière par rapport à des molécules comme le bleu d'Evans (EB, MW=961, fortement lié aux protéines plasmatiques). Le bleu d'Evans fut un des premiers biomarqueurs à être utilisé pour évaluer l'état de la BHE de façon macroscopique que ce soit dans des études sur animaux ou chez l'Homme. En outre, des techniques de quantification de la fixation de l'EB ont été développées au niveau de zones cérébrales où une rupture de la BHE a été observée visuellement mais leur fiabilité reste controversée (6). De plus, l'utilisation de ce marqueur nécessite des analyses *ex vivo* pour avoir une idée de sa fixation dans les zones lésées, ce qui complique son utilisation.

D'autres marqueurs de haut poids moléculaire ont été investigués tels que les protéines radiomarquées (albumine MW=65 000), les dextrans (MW=1 500-70 000) ou l'inuline (MW=6179), cependant leur utilisation reste inappropriée pour prédire le passage des molécules de faible MW (2,6).

Des agents robustes d'imagerie *in vivo* sont nécessaires pour étudier les processus biologiques comme l'ouverture transitoire de la BHE dans le cerveau humain.

III. Méthodes d'imagerie utilisées pour évaluer la perméabilité de la BHE *in vivo*

Les techniques d'imagerie permettent de déterminer *in vivo* l'intégrité de la BHE avec des perspectives translationnelles. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) dynamique avec contraste (DCE) et l'IRM dynamique avec contraste de susceptibilité (DSC) utilisant des agents de contraste à base de gadolinium (Gd) tels que le gadotérate (MW=558) ou le Gd-DTPA (acide Gd-diéthylène triamine pentaacétique, MW=546) sont largement utilisés pour détecter la perturbation locale de la BHE associée à certaines pathologies telles que les accidents ischémiques cérébraux ou les tumeurs cérébrales (8).

C'est une technique d'imagerie non-invasive se basant sur les propriétés magnétiques des molécules d'eau permettant d'obtenir des vues anatomiques du tissu nerveux. En effet, les atomes d'hydrogène des molécules d'eau, possèdent un "moment magnétique" appelé spin, qui agit comme un aimant. La création d'un champ magnétique (B_0) par la machine permet d'orienter toutes les molécules d'eau présentes dans le corps suivant B_0 . Une antenne placée sur le crâne va permettre d'émettre et de réceptionner certaines fréquences. A l'émission, la fréquence induite va faire basculer les spins des atomes d'hydrogène dans un plan perpendiculaire à B_0 . Lorsque l'antenne arrête d'émettre, les spins reviennent à leur position d'origine en émettant à leur tour une fréquence captée par l'antenne. La relaxation T1 caractérise la réapparition de l'aimantation longitudinale et la relaxation T2 caractérise la disparition de la relaxation transverse (**Figure 59**). Cette fréquence sera traitée comme un signal électrique permettant son analyse. Suivant le contenu en eau des différentes régions du SNC, ce signal va permettre de reconstruire une image tissulaire anatomique.

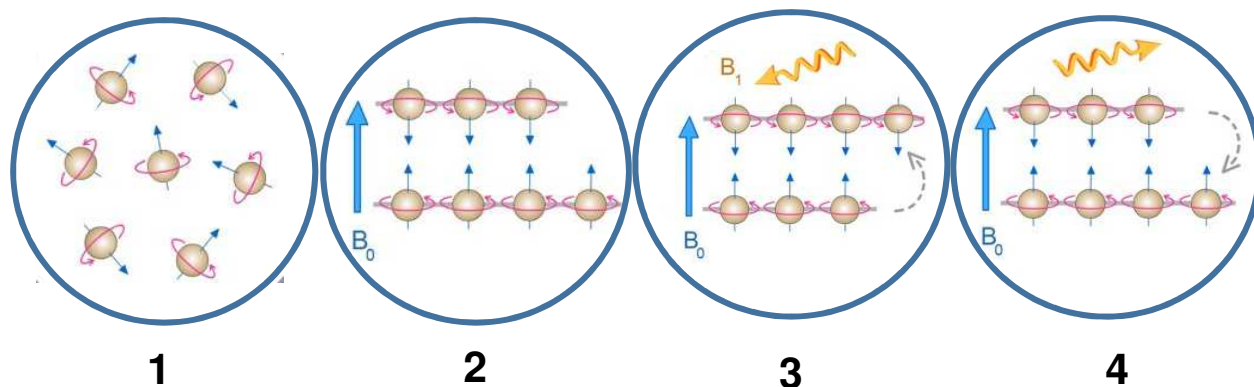


Figure 59: Principe de l'imagerie par Résonance magnétique IRM (Schéma adapté source site CEA, Corinne Beurtey).

L'IRM repose sur les propriétés d'aimantation des protons d'hydrogène des molécules d'eau présentes dans le corps. En l'absence de champ magnétique les protons sont orientés de manière aléatoire (1), l'application d'un champ magnétique B_0 permet d'orienter les spins des molécules d'eau selon B_0 (2). La genèse d'une onde radio B_1 synchronise et fait basculer les spins (3). Puis une fois que l'onde B_1 est arrêtée, les protons d'hydrogène reviennent à leur position initiale en restituant l'énergie absorbée. L'analyse du signal récupéré va permettre de générer une image anatomique.

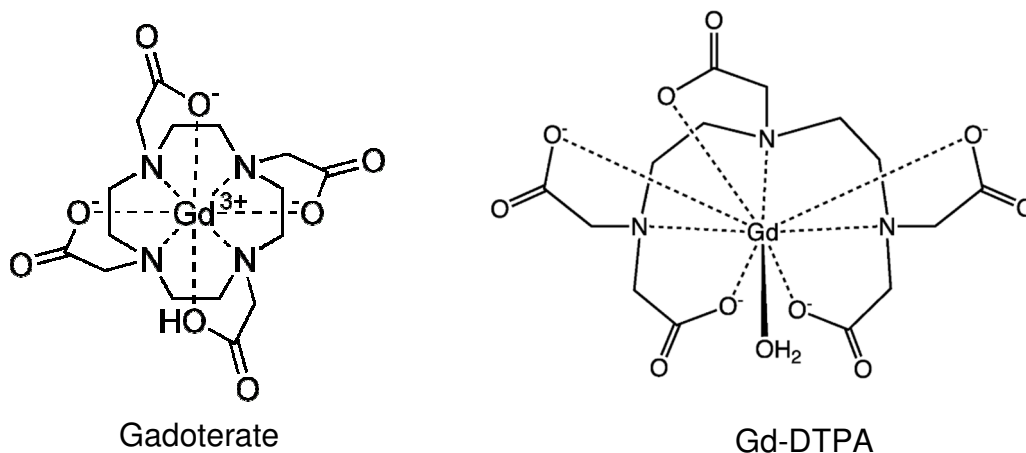


Figure 60: Structures chimiques des agents de contrastes couramment utilisés en IRM.

L'ion métallique gadolinium Gd^{3+} est complexé avec un chélate pour diminuer sa toxicité (Figure 60). En conditions physiologiques, le passage de ces chélates paramagnétiques est bloqué, cependant, une perte de l'intégrité de la BHE permet le passage et l'accumulation de ces molécules dans des régions cérébrales spécifiques où la BHE est rompue. Cette accumulation extracellulaire va permettre d'influencer et notamment d'augmenter la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau, augmentant ainsi le contraste des images (Figure 61) (9). L'IRM DCE permet

d'obtenir des mesures de la perméabilité sur les images en T1W comme la surface affectée et le DSC permet d'évaluer les propriétés de perfusion cérébrale en T2W.



Figure 61: Images IRM T1W représentatives chez 3 patients atteints de glioblastome (*D'après Artzi et al, 2015*)

La Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP) cérébrale du cerveau utilisant le ^{99m}Tc -DTPA (MW=487) est également utilisée (10).

Malgré les performances quantitatives limitées, l'utilisation prédominante de l'IRM et de la TEMP pour étudier l'intégrité de la BHE est probablement due à la disponibilité des sondes d'imagerie correspondantes (11). En effet, les agents de contrastes sont commercialisés depuis les années 1980. Par contre, leur utilisation est déconseillée depuis quelques années pour les patients souffrant d'insuffisance rénale sévère suite à l'apparition d'une fibrose systémique néphrogénique (FSN) observée chez ces derniers. Un lien a pu être établi entre l'administration des chélates de gadolinium et l'apparition des premiers symptômes de la FSN. Leur récente localisation trouvée au niveau de certaines régions cérébrales soulève la question de leur accumulation dans l'organisme (12). Ces considérations prouvent la nécessité de développer d'autres biomarqueurs de la perméabilité de la BHE.

La TEP peut permettre une modélisation cinétique précise et une estimation quantitative du transfert de substances radiomarquées à travers la BHE *in vivo* (13). Cependant, la TEP utilisant des molécules radiomarquées de faible poids moléculaire comme marqueurs de l'intégrité de la BHE, comme le ^{18}F -1-fluoro-1-désoxy-D-mannitol (MW=183) n'a pas atteint une utilisation courante (14), probablement en raison de leur coût et de leur disponibilité limitée dans le monde dans les centres non équipés d'un cyclotron.

IV. $[^{18}\text{F}]$ -2- fluoro-2-désoxy-sorbitol ($[^{18}\text{F}]$ FDS) : un traceur candidat

Le sorbitol, un stéréoisomère du mannitol, est une petite molécule hydrophile non transportée (MW=182) qui est peu métabolisée chez les mammifères. Le dérivé fluoré $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-2-désoxy-sorbitol ($[^{18}\text{F}]$ FDS, MW=183) peut être obtenu dans tous les services de médecine nucléaire à partir de la réduction chimique d'un produit commercialisé : le $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-2- déoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]$ FDG) (**Figure 64**) (15).

Le $[^{18}\text{F}]$ FDS présente une captation cérébrale non significative chez les rongeurs et les humains sains (16,17) et bénéficie de propriétés pharmacocinétiques favorables pour l'imagerie TEP quantitative *in vivo* (18,19). En effet, une étude de biodistribution et l'impact des radiations via des analyses dosimétriques chez des humains sains a montré que le $[^{18}\text{F}]$ FDS était bien toléré. Il est rapidement éliminé du pool sanguin par le système urinaire avec une dose efficace comparable aux autres radiotraceurs marqués au $[^{18}\text{F}]$ (**Figure 62**) (17). Sa faible fixation au niveau des organes fait de lui un bon candidat pour tester son utilisation pour des études au niveau rénal pour visualiser une potentielle obstruction du système urinaire (18).

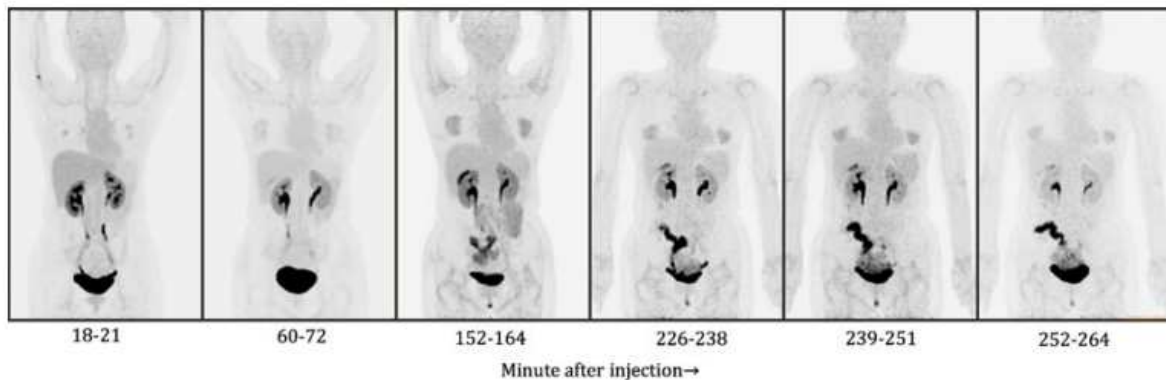


Figure 62: Images séquentielles de projection d'intensité maximale (MIP) corps entier chez l'homme après injection du $[^{18}\text{F}]$ FDS (D'après Zhu et al, 2016)

V. Ouverture transitoire de la BHE grâce à la méthode des ultrasons focalisés (FUS).

De nombreuses stratégies et technologies ont été proposées pour surmonter l'étanchéité de la BHE et permettre une administration suffisante de produits thérapeutiques dans le cerveau (20). Parmi ces stratégies, les ultrasons focalisés associés à des microbulles (FUS) apparaissent comme un moyen efficace d'augmenter localement et temporairement la perméabilité de la BHE, principalement par l'ouverture de la voie paracellulaire en perturbant les jonctions serrées (21). La méthode des ultrasons focalisés est devenue une méthode attractive, sûre et reproductible pour permettre l'ouverture transitoire de la BHE via un phénomène de sonoporation. L'injection de microbulles en intraveineux va permettre la dissémination de celles-ci au niveau de l'intégralité du système sanguin. Suite à l'impulsion d'ondes ultrasonores sur des zones corporelles spécifiques, ces dernières vont provoquer des oscillations mécaniques au sein des tissus qu'elles traversent entraînant ainsi la vibration des molécules qui y sont présentes. Les microbulles préalablement injectées et présentes à l'intérieur des vaisseaux vont alors entrer dans un état oscillatoire augmentant ainsi la pression appliquée sur l'endothélium. Ce phénomène dit de cavitation va permettre ainsi la perturbation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales générant ainsi une perméabilisation locale de la BHE.

Cette technique ouvre la voie à des possibilités et des perspectives thérapeutiques diverses jusqu'à maintenant impossible due à la forte étanchéité de la BHE empêchant ainsi les substances tels que les médicaments de passer du compartiment sanguin au parenchyme cérébral dans les pathologies neurologiques (22). En effet, suite à un protocole FUS l'accessibilité au parenchyme cérébral devient alors possible pour des molécules pouvant atteindre les 150 kDa (23). En conditions physiologiques, uniquement de petites molécules <400 Da avec des caractéristiques physico-chimiques spécifiques telle que l'hydrophylité sont capables de franchir cette BHE. Diverses délivrances ciblées de médicaments ont été testées dans divers modèles précliniques. De plus, le temps d'ouverture peut varier de plusieurs minutes à des (ou plusieurs) heures selon le protocole FUS utilisé. Une étude menée sur un modèle préclinique de glioblastome chez le rat a mis en évidence que l'utilisation du protocole FUS était capable d'augmenter localement la concentration d'un médicament anticancéreux, permettant ainsi d'observer des effets bénéfiques

sur la progression tumorale monitorée en IRM ainsi que sur la survie des animaux (**Figure 63**) (24).

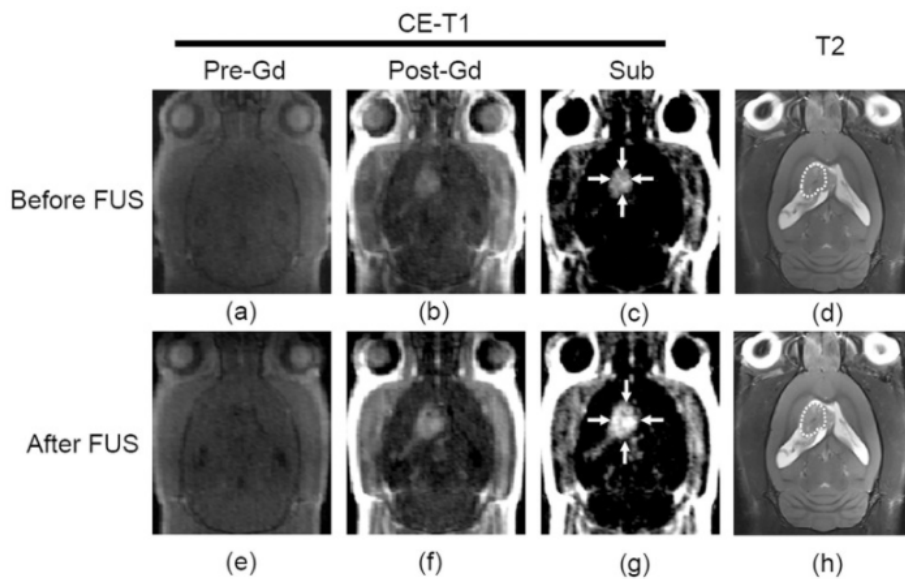


Figure 63: Images IRM représentatives avant et après ouverture de la BHE suite à un protocole FUS au niveau de tumeurs cérébrales chez le rat (D'après Wei et al, 2013).

(a, e) images T1-W; (b, f) images Gd-DTPA contrast-enhanced T1-W; (c, g) images T1 soustraites après et avant injection de Gd-DTPA; (d, h) images T2-W

Dès lors, des essais cliniques ont été menés afin de déterminer la faisabilité de cette approche chez l'Homme. Un essai a montré que l'ouverture répétée de la BHE chez des patients atteints de glioblastome était sûr et bien toléré chez les patients (25).

Cependant, le développement de la technique FUS est étroitement lié à la disponibilité de marqueurs de l'intégrité de la BHE, dans le but d'évaluer quantitativement l'impact des différentes conditions des FUS sur l'augmentation de la perméabilité de la BHE (26).

OBJECTIFS

Cette étude vise à évaluer la TEP au [^{18}F]FDS comme technique quantitative d'imagerie *in vivo* de la perméabilité accrue de la BHE induite par les FUS. À cette fin, les conditions des FUS transcrâniens ont été optimisées pour induire de manière peu invasive une perturbation hémisphérique de la BHE chez la souris. La cinétique du [^{18}F]FDS à travers la BHE a été comparée dans l'hémisphère traité par ultrasons et l'hémisphère non traité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Production du [¹⁸F]FDS

La synthèse du [¹⁸F]FDS à partir du [¹⁸F]FDG commercial a été décrite par Li et ses collaborateurs (15). Du NaBH₄ (2 mg) a été ajouté à 4 mL de [¹⁸F]FDG (180-200 MBq, Curium, Saclay, France). Après 15 min de réaction à température ambiante, 10 µL d'acide acétique (0,15 mmol) ont été ajoutés. Le mélange est passé à travers une cartouche Sep-Pak Alumina-N-Plus-Long (Waters, Guyancourt, France). La pureté radiochimique a été vérifiée par radio chromatographie sur couche mince sur des plaques d'alumine recouvertes de gel de silice (Merck, Guyancourt, France). La phase mobile était constituée d'acétonitrile/eau (80/20, v/v). Un seul pic avec un facteur de retard (Rf)=0,6 a été observé. À titre comparatif, le Rf du [¹⁸F]FDG était de 0,9.

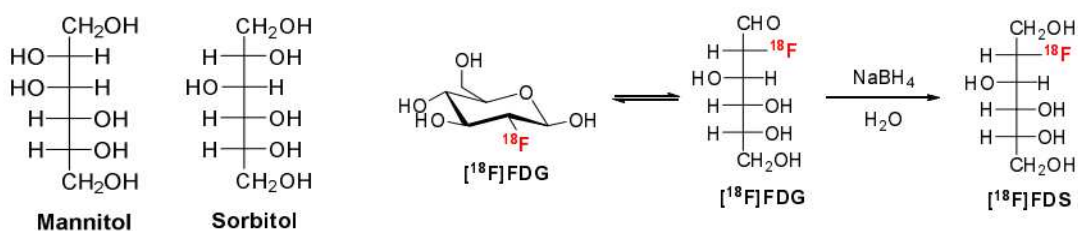


Figure 64: Structures chimiques du mannitol, sorbitol, [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-glucose ([¹⁸F]-FDG) et du 18 F-2-fluoro-2-deoxy-sorbitol ([¹⁸F]FDS).

II. Ultrasons focalisés (FUS)

La méthode de perturbation de la BHE contrôlée dans l'espace a été optimisée par le Dr. Anthony Novell, chercheur au sein de l'équipe Développements Méthodologiques et Instrumentation de BioMaps, à partir de travaux antérieurs (23) afin d'induire une perturbation reproductible de la BHE dans l'hémisphère cérébral droit uniquement. Les expériences ont été réalisées à l'aide de souris femelles NMRI nu/nu dépourvues de poils, afin de limiter la distorsion de la transmission transcrânienne des ultrasons. Des souris femelles NMRI nu/nu âgées de sept semaines ont été anesthésiées avec de l'isoflurane à 1,5 % dans de l'O₂. Un cathéter a été inséré dans la veine caudale et l'animal a été transféré dans le système de sonication. Un transducteur focalisé (diamètre actif 25 mm, profondeur focale 20 mm, résolution axiale 5 mm, résolution latérale 1 mm, Imasonic, Voray sur l'Ognon, France) centré à 1,5 MHz a été utilisé pour perturber la BHE. Le

transducteur a été connecté à un générateur programmable monocanal (Image Guided Therapy, Pessac, France) et monté sur une platine motorisée à axe XYZ et positionné au-dessus de la tête de la souris maintenue sous anesthésie. Le dispositif a été couplé au crâne de la souris à l'aide d'un ballon en latex (rempli d'eau dé-ionisée et dégazée) et d'un gel de couplage. La distance entre le transducteur et le crâne a été ajustée par le déplacement de l'axe motorisé (Z) et le remplissage du ballon afin d'obtenir le centre de l'hémisphère droit du cerveau, à la distance focale (c'est-à-dire 20 mm). Des microbulles SonoVue® (Bracco, Italy) ont été administrées par voie intraveineuse dans la veine caudale via un bolus (50 µl) avant le début des sessions FUS (n=5) ou Sham (n=3). La séquence FUS était composée d'ondes ultrasonores transmises pendant 3,5 s à 1,5 MHz avec un rapport cyclique de 71 % et une pression négative maximale de 525 kPa. Par conséquent, la pression transmise dans le cerveau de la souris a été estimée à 420 kPa en considérant une atténuation du crâne de 20 % à 1,5 MHz (27). Un balayage mécanique (axe XY) a été synchronisé avec la sortie du générateur afin d'induire une ouverture de la BHE du cerveau hémisphérique de 6 mm (antérieur-postérieur) × 3,6 mm (hémisphère droit latéral). La séquence a été répétée 36 fois pour une exposition totale de 126,4 s (**Figure 65**).

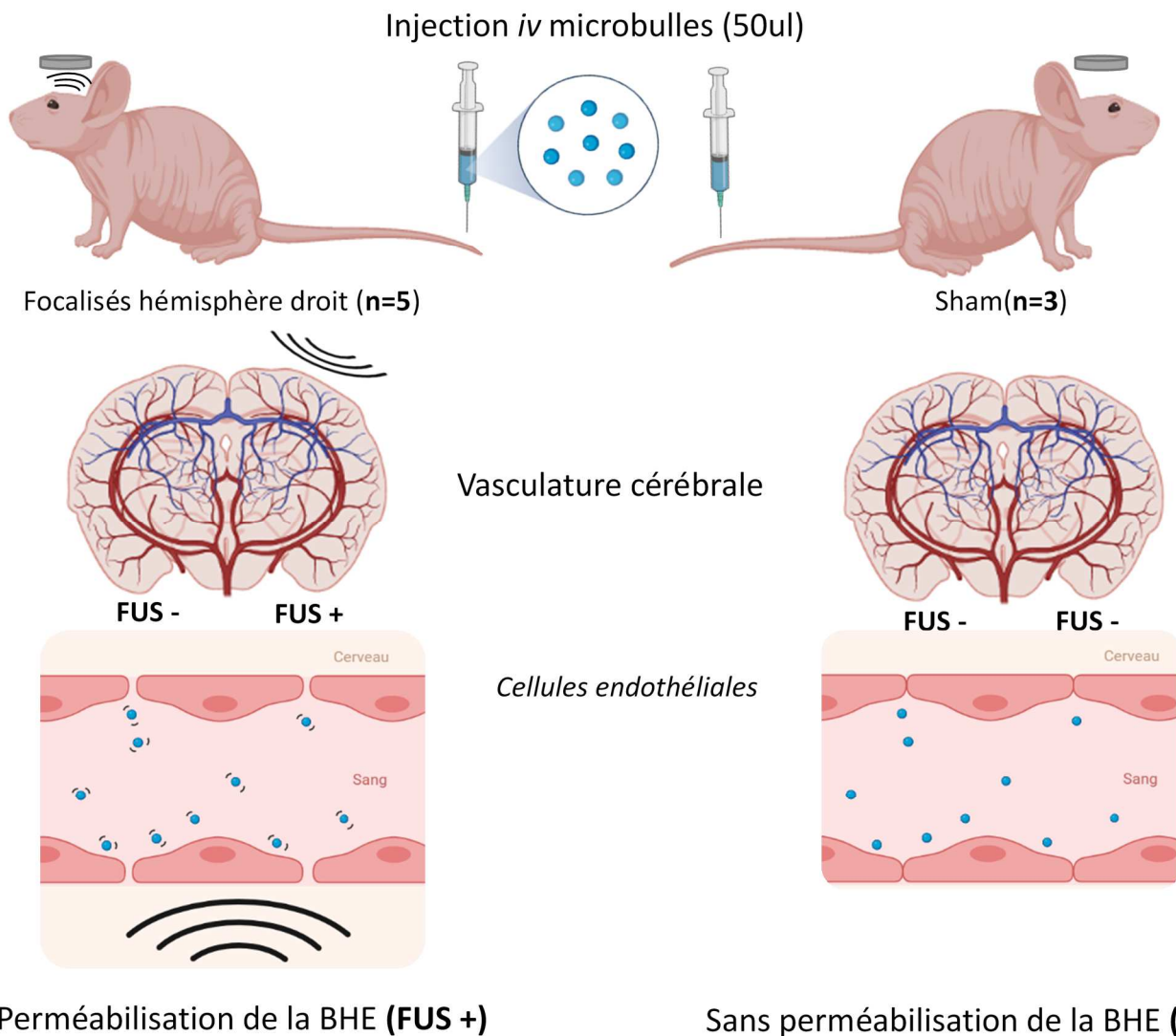


Figure 65: Schématisation du protocole expérimental utilisé pour cette étude

L'ouverture hémisphérique de la BHE a été induite sur des souris NMRI nu/nu (n=5). Les ondes ultrasonores ont été générées sur le côté droit (FUS+). Le côté controlatéral (FUS-) n'a pas reçu de perturbations des ondes mécaniques au sein du tissu cérébral. Un groupe de souris contrôle (n=3) a également été utilisé sans genèse d'ondes ultrasonores quel que soit l'hémisphère cérébral.

III. Test d'extravasation au bleu d'Evans

Le succès de l'ouverture de la BHE a été confirmé par l'extravasation du colorant EB. En bref, 100 µl d'EB à 4 % ont été injectés par voie intraveineuse immédiatement après la session FUS (ou Sham). L'EB (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 4% dans NaCl 0,9% a été fraîchement préparé comme décrit précédemment (28). Une heure après l'injection, c'est-à-dire à

la fin de l'acquisition TEP, les animaux ont été euthanasiés et les cerveaux ont été prélevés pour évaluer visuellement l'extravasation de l'EB (**Figure 69**). Dans notre étude, les caractéristiques fluorescentes de l'EB (pic d'excitation compris entre 470 et 540 nm ; émission à 680nm) ont été utilisées pour observer *ex vivo* par un microscope à fluorescence la zone cérébrale impactée par l'ouverture de la BHE. Pour cela, un cerveau congelé FUS a été sectionné avec un cryostat (Leica CM3050 S, Leica). Une coupe de cerveau a été scannée avec un objectif 20x, à l'aide d'un microscope AxiObserver Z1 (Zeiss, Allemagne) pour évaluer la distribution de la fluorescence du colorant EB au niveau d'une coupe coronale de cerveau de souris après application du protocole FUS dans l'hémisphère cérébral droit. Ensuite, une coupe de cerveau représentative acquise en microscopie (EB) et son examen TEP respectif ont été recalés sur un modèle IRM (Mironne, 2007) via le logiciel Pmod pour comparer la localisation du signal TEP *in vivo* (SUV) avec la fluorescence de l'EB *ex vivo*.

IV. Imagerie TEP au [¹⁸F]FDS

Immédiatement après l'injection d'EB, les souris anesthésiées ont été transférées au scanner microPET (Inveon, microPET, Siemens Healthcare, Knoxville, TN, USA).

Le [¹⁸F]FDS a été administré par voie intraveineuse ($4,2 \pm 0,76$ MBq) à l'aide d'une pompe à micro-injection à un débit de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Siemens Healthcare) ($n=5$ FUS ; $n=3$ Sham). L'acquisition TEP dynamique (60 min) a commencé dès l'injection du [¹⁸F]FDS. Les images TEP ont été corrigées de l'atténuation, des coïncidences aléatoires et de la diffusion avant d'être reconstruites par l'algorithme 3D OSEM/MAP. Des volumes d'intérêts (VOIs) ont été délimités manuellement à l'aide du logiciel Pmod (version 3.8, PMOD Technologies Ltd, Zurich, Suisse). Dans le groupe FUS, la fixation du [¹⁸F]FDS dans le parenchyme cérébral était évidente dans la zone de sonication sur les images TEP tardives. La région où la BHE est perturbée a été délimitée et reflétée dans l'hémisphère controlatéral. Chez les animaux Sham, les VOI ont été dessinés dans chaque hémisphère cérébral (**Figure 66**). Une autre VOI a été dessinée sur l'aorte (pool sanguin), évidente sur les premiers temps, pour générer une fonction d'entrée dérivée de l'image (IDIF).

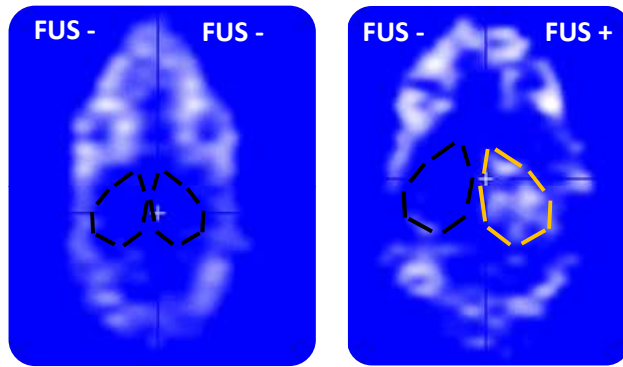


Figure 66: Exemple de Volume d'intérêt VOI pris en compte pour l'extraction des courbes d'activité en fonction du temps sur les examens TEP dynamiques.

Les courbes d'activité temporelle (TAC) en kBq/cc ont été corrigées pour prendre en compte la décroissance radioactive et le poids des animaux, elles ont été exprimées en valeur de fixation normalisée (SUV) en fonction du temps. Les aires sous ces courbes d'activités (AUC) ont été calculées de 0 à 15, 30 et 60 minutes ainsi que les rapports $AUC_{\text{cerveau}}/AUC_{\text{sang}}$ correspondants.

1. Approches quantitatives en TEP : la modélisation

La modélisation en imagerie TEP nous permet d'accéder à différents paramètres quantitatifs pour étudier la biodistribution d'un radiotracer ainsi que de suivre sa cinétique au sein de l'organisme. Il existe plusieurs types de modèles, à compartiments, suite à l'utilisation de régions de référence ou des modèles non-compartmentaux. Dans notre étude, pour quantifier la perméabilité de la BHE grâce à l'imagerie TEP, des modèles simples ont été utilisés.

a. Modèle Logan

Le modèle Logan est une méthode d'analyse graphique se basant sur la régression linéaire, il est utilisé pour des systèmes ayant des récepteurs réversibles et permet d'estimer le volume total de distribution V_T . La concentration tissulaire en radiotracer obtenue en fonction du temps ($C_{\text{Tissu}}(t)$) va prendre en compte l'activité plasmatique. Après avoir atteint un temps d'équilibre suffisant au sein du système (t^*), le tracé de la fonction va se rapprocher d'une droite où on pourra déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine (pente = volume total de distribution).

b. Modèle à 1-compartiment (1-cpt)

Dans un modèle à 1 seul compartiment, on considère que la concentration en radiotraceur est la même en tout point du système artériel. Le radiotraceur va pouvoir alors être distribué de façon uniforme à travers le corps. La concentration $C_1(t)$ du radiotraceur au sein du tissu va pouvoir alors être extraite en fonction du temps. Dans cette hypothèse, la radioactivité observée au sein de la région d'intérêt ne prend pas en compte les radiométabolites car la $C_1(t)$ est proportionnelle à la concentration du radiotraceur intact retrouvée dans le plasma (**Figure 67**).

Le modèle permet de déterminer des constantes de transferts :

- K_1 : constante de transport du sang vers le tissu ($\text{mL}/\text{cm}^3/\text{min}$)
- k_2 : constante de transport du tissu vers le sang (min^{-1})
- V_t : volume de distribution dans le compartiment tissulaire $V_t=K_1/k_2$ (mL/cm^3)

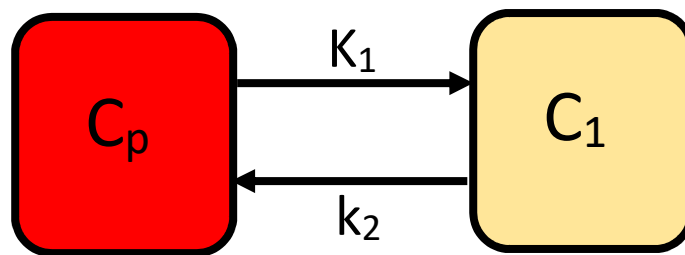


Figure 67: Schématisation d'un modèle à un compartiment en imagerie TEP

C_p : concentration plasmatique artérielle du radiotraceur ; C_1 : concentration en radiotraceur au niveau tissulaire ; K_1 ($\text{mL}/\text{cm}^3/\text{min}$) ; k_2 (min^{-1}) ; $V_t=K_1/k_2$ (mL/cm^3).

Le modèle repose alors sur l'équation différentielle suivante :

$$dC_1(t)/dt = K_1 C_p(t) - k_2 C_1(t)$$

La modélisation cinétique des données TEP a été réalisée en utilisant la méthode graphique de Logan (29) et un modèle à 1 compartiment tissulaire (1-cpt) utilisant l'IDIF pour estimer le volume total de distribution (V_T , $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-3}$) du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ et décrire son transport à travers la BHE. Une cartographie paramétrique du volume total de distribution (V_T) du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ a été générée (**Figure 69B**).

V. Analyse Statistique

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm S.D. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9.1, La Jolla, CA, USA. Les paramètres de la modélisation cinétique ont été comparés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs ("hémisphère", "groupe"), suivie d'une comparaison multiple de Tukey. Les rapports de la radioactivité mesurée dans l'hémisphère droit par rapport à l'hémisphère gauche, ainsi que les données sanguines obtenues dans le groupe FUS et le groupe sham, ont été comparés à l'aide du test U de Mann-Whitney. Le test de Pearson a été utilisé pour vérifier la corrélation entre les différents paramètres cinétiques obtenus. La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$. La variabilité intra-groupe des paramètres de résultats a été estimée par le coefficient de variation ($CV = 100 \times S.D./moyenne$).

RÉSULTATS

La transformation chimique du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ en $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ a été très efficace (Figure 64). L'analyse en radio-chromatographie sur couche mince (CCM) de la solution a révélé un pic unique avec un facteur de retard (R_f) = 0,6, ce qui correspond à la présence de $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ (15). Le R_f du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ non transformé, testé dans les mêmes conditions de CCM, était de 0,9 (données non présentées). Aucun $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ n'a pu être détecté par cette méthode dans la préparation finale de $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$.

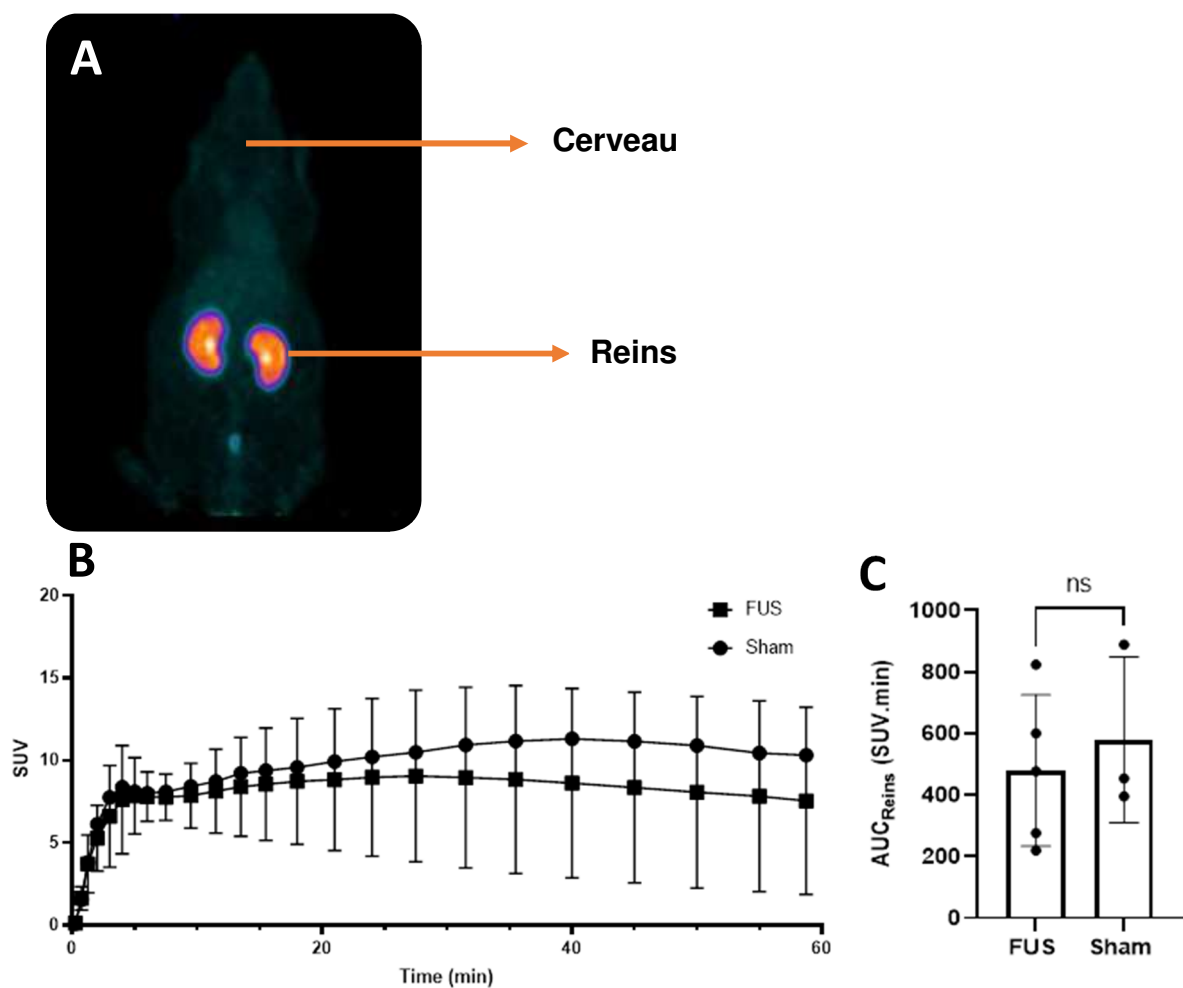


Figure 68: Fixation du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ au niveau périphérique chez des souris NMRI nu/nu

Image représentative SUV en MIP (Maximal Intensity projection) (A). Cinétique d'accumulation du radiotracer au niveau des reins (B). Comparaison des aires sous la courbe (AUC) en t-test (C).

Afin de confirmer la biodistribution du radiotracer précédemment décrite (15,17), des analyses de la fixation du radiotracer en périphérie ont été effectuées dans notre modèle animal. Sur l'image SUV représentative (en MIP= maximal intensity projection), une forte fixation est observée au niveau des reins et peu de traceur se fixe au niveau des autres organes périphériques (**Figure 68A**). La cinétique de fixation au niveau des reins a été extraite pour les 2 groupes (FUS et Sham), une accumulation rapide du [¹⁸F]FDS est observée suggérant une élimination rapide du radiotracer par voie urinaire (**Figure 68B**). Les AUC_{reins} ont été calculées et comparées. Aucune différence significative entre le groupe FUS et Sham n'a été observée (p=0.61) (**Figure 68C**).

Après avoir étudié la fixation du radiotracer en périphérie, nous avons étudié l'impact de l'ouverture de la BHE sur sa fixation au niveau cérébral. Chez les animaux FUS, une forte coloration de bleu Evans (EB) a été observée dans la partie postérieure de l'hémisphère traité par ultrasons (droit) uniquement (**Figure 69A**). Une faible coloration en EB a été observée dans les vaisseaux sanguins cérébraux de l'hémisphère controlatéral, ainsi que chez les animaux Sham. En effet, aucune perfusion pour éliminer le sang circulant du tissu cérébral n'a été effectuée afin de pouvoir interpréter les résultats en *ex vivo* et *in vivo*. Cela confirme que la coloration en EB peut être utilisée comme un contrôle positif pour valider une perturbation efficace de la BHE. Les images TEP chez les animaux Sham ont confirmé une fixation cérébrale négligeable du [¹⁸F]FDS avec une BHE intacte, alors qu'un fort signal TEP a pu être observé dans l'hémisphère cérébral soumis aux ultrasons chez les animaux FUS (**Figure 69B**). Les images TEP paramétriques, exprimées en V_T, étaient très similaires aux images TEP en unités SUV, montrant une augmentation évidente de la fixation du [¹⁸F]FDS qui était strictement localisée dans l'hémisphère droit, avec un impact limité sur l'hémisphère gauche (**Figure 69C**). La distribution cérébrale du signal TEP [¹⁸F]FDS était similaire à l'extravasation de l'EB observée au niveau du cerveau entier et sur les coupes cérébrales, démontrant ainsi la perméabilisation de la BHE au niveau de l'hémisphère cérébral droit après l'application du protocole FUS (**Figure 69D**). Il est intéressant de noter que la cartographie de la distribution cérébrale du [¹⁸F]FDS dans la zone traitée par les FUS a montré un gradient du centre vers la périphérie qui n'a pas été observé en utilisant l'EB comme marqueur de l'intégrité de la BHE chez les mêmes animaux (**Figure 69**).

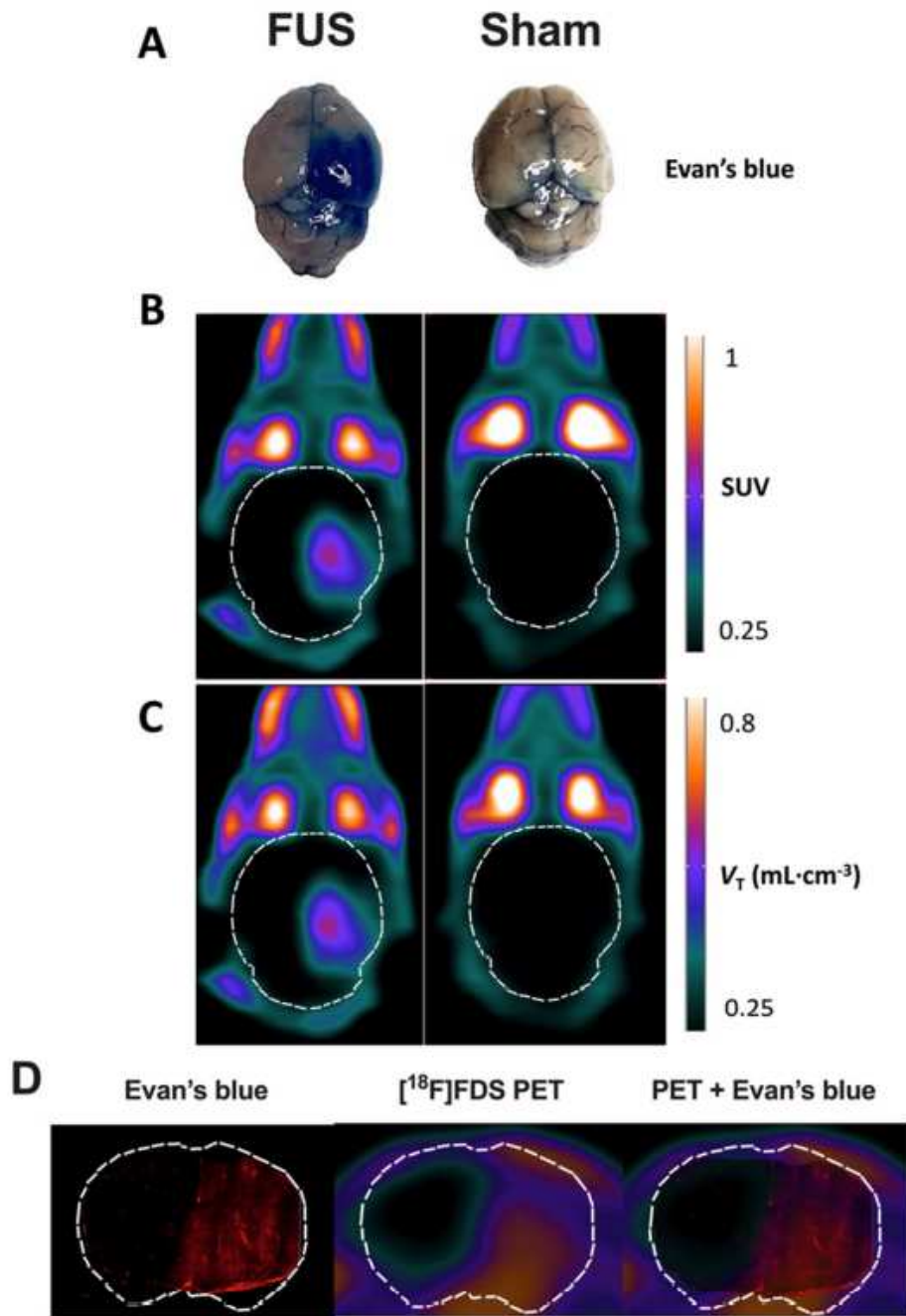


Figure 69: Impact des ultrasons focalisés (FUS) sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) évaluée à l'aide de l'extravasation du bleu Evans.

L'impact des ultrasons focalisés (FUS) sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) évaluée par l'extravasation du bleu Evans et la tomographie par émission de positons (TEP) utilisant le [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxysorbitol ([¹⁸F]FDS). L'extravasation du bleu Evans était évidente dans l'hémisphère cérébral droit des animaux du groupe FUS (A). Images TEP cérébrales normalisées en SUV (somme 30-60 min) de l'accumulation du [¹⁸F]FDS après la rupture hémisphérique de la BHE induite par les ultrasons focalisés (FUS) ou sans (Sham) sont présentées en (B). Les cartes paramétriques correspondantes décrivant le volume total de distribution (V_T), estimé à l'aide du modèle à un seul compartiment tissulaire de 0 à 60 min, sont présentées dans (C). En (D), la distribution de la fluorescence du colorant bleu Evans dans une coupe coronale *ex vivo* de cerveau de souris FUS a été superposée à la coupe correspondante de la TEP [¹⁸F]FDS obtenue *in vivo* chez le même animal.

Dans les hémisphères où la BHE est intacte (animaux Sham ou hémisphère controlatéral (FUS-), le signal TEP cérébral a augmenté rapidement avec une absorption maximale à $T_{max} = 4$ min, suivie d'une lente diminution de la radioactivité. Par contre, le signal TEP a été augmenté sélectivement dans l'hémisphère droit, traité par les FUS et le T_{max} a été atteint plus tardivement à 13,5 minutes, suivi d'un plateau d'accumulation du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ jusqu'à la fin de l'acquisition (**Figure 70A,B**). Les valeurs SUV au niveau de l'hémisphère traité par les FUS (droit) à 15, 30 et 60 minutes sont significativement plus élevées que les valeurs de l'hémisphère gauche non soumis aux FUS ($p < 0.01$) (**Figure 70 A**).

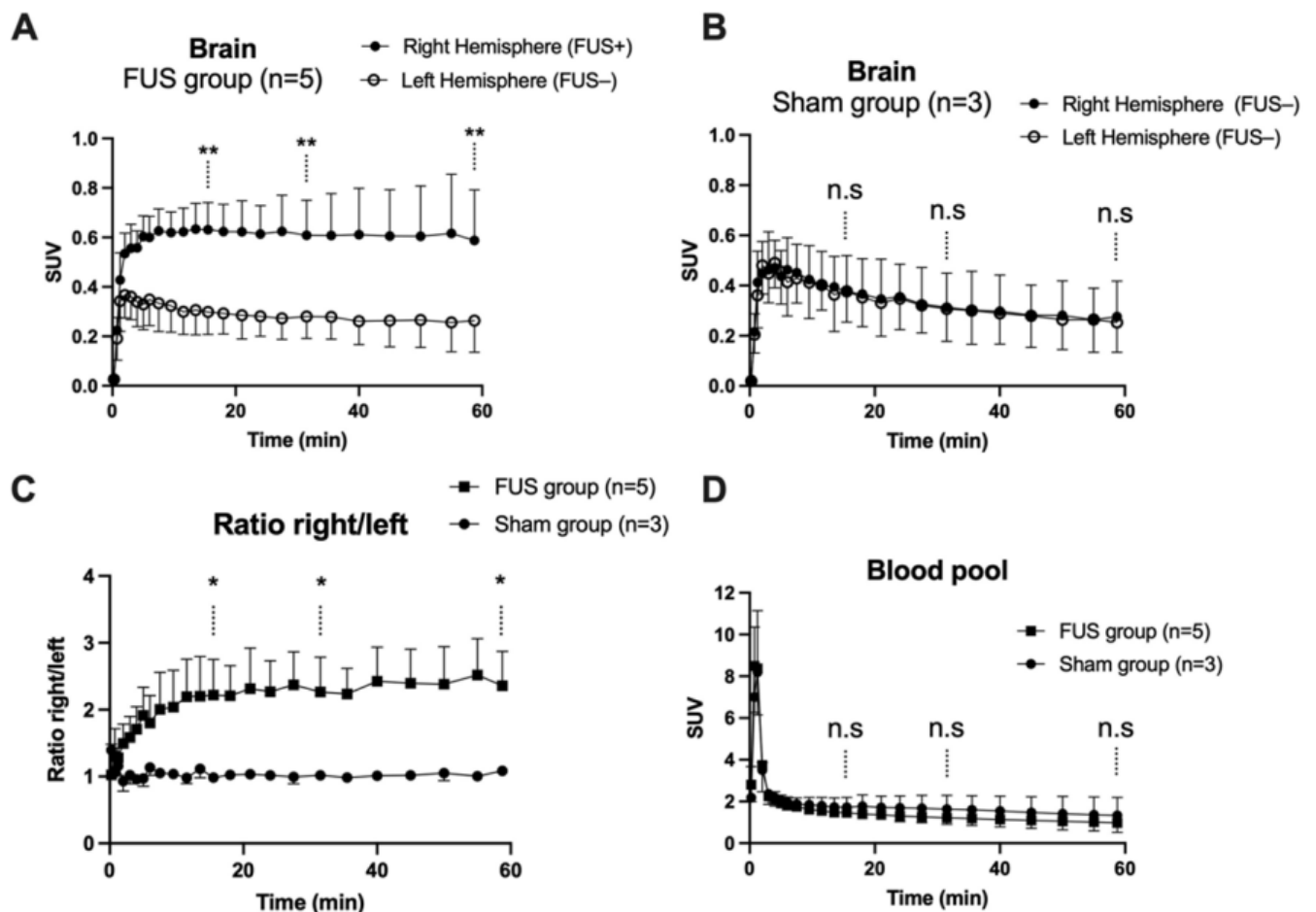


Figure 70: Cinétique du $[^{18}\text{F}]\text{2-fluoro-2-déoxy-sorbitol}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FDS}$).

La rupture de la BHE a été obtenue dans l'hémisphère cérébral droit en utilisant les ultrasons focalisés (groupe FUS $n = 5$, en (A), mais pas dans le groupe sham ($n = 3$, en (B)). L'évolution dans le temps du rapport droite/gauche du signal TEP chez les animaux FUS et sham est illustré en (C). Les fonctions d'entrée dérivées des images TEP sont présentées en (D). Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm S.D. La comparaison statistique des valeurs obtenues à 15, 30 et 60 minutes après l'injection de $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ est indiquée par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s = non significatif.

L'exposition cérébrale ($AUC_{0-60min}$) du [^{18}F]FDS dans l'hémisphère soumis aux FUS était significativement plus élevée que dans la zone controlatérale (AUC_{FUS+}/AUC_{FUS-} : $2,12 \pm 0,5$ fois plus, $p < 0,01$) ou le groupe Sham ($AUC_{FUS+}/AUC_{SHAM-FUS-}$) $1,84 \pm 0,4$ fois plus, $p < 0,05$) (**Figure 71A**). Le rapport du signal TEP de la zone cérébrale soumise aux FUS sur la région controlatérale augmente de 0 à 15 min puis atteint un plateau (**Figure 70C**). Le protocole FUS n'a pas eu d'impact sur la cinétique du [^{18}F]FDS dans la circulation sanguine, aucune différence significative n'a été observée dans les AUC_{sang} entre le groupe FUS et le groupe Sham ($p > 0,05$) (**Figure 70D**).

Les TACs cérébrales ont été décrites avec précision soit par la méthode graphique de Logan, soit par le modèle 1-cpt. L'utilisation de ces deux modèles a fourni une estimation similaire du V_T cérébral du [^{18}F]FDS dans chaque hémisphère avec un ajustement acceptable (erreur $< 3\%$, **Figure 71B**). Une relation linéaire entre les V_T de la méthode graphique Logan et ceux du modèle 1-cpt a été observée ($r^2 = 0,99$) (**Figure 72**). Dans le groupe FUS, nous avons observé une augmentation significative du V_{T-1cpt} du [^{18}F]FDS dans la région traitée aux FUS par rapport à la région controlatérale (augmentation de $2,43 \pm 0,8$ fois, $p < 0,001$) ou au cerveau des animaux Sham (augmentation de $1,97 \pm 0,2$ fois, $p < 0,01$). Dans le groupe FUS, la variabilité des valeurs de V_{T-1cpt} était plus faible dans l'hémisphère traité (CV = $10,1\%$) que dans l'hémisphère non traité (CV = $29,7\%$). La modélisation compartimentale a en outre permis d'estimer les constantes de transfert K_1 et k_2 avec un ajustement acceptable (erreur $< 7\%$). Cependant, le K_1 des animaux du groupe FUS était associé à une variabilité élevée dans la zone non soumise aux FUS (CV = $37,6\%$) par rapport à la région traitée aux FUS (CV = $18,5\%$). Le V_{T-1cpt} a donc été retenu comme paramètre de référence pour décrire la distribution cérébrale du [^{18}F]FDS dans toutes les conditions testées.

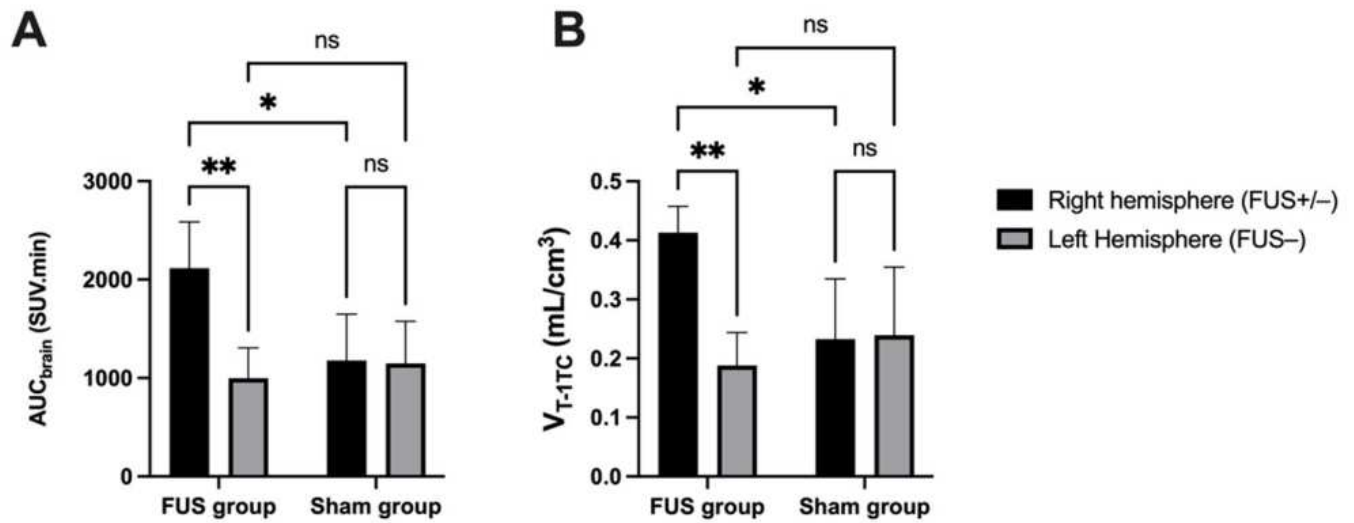


Figure 71: Pharmacocinétique des données TEP cérébrales du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$.

La perturbation de la BHE induite par les ultrasons (FUS+) a été obtenue dans l'hémisphère cérébral droit alors que la BHE dans l'hémisphère cérébral controlatéral était intacte (FUS-). En (A), les expositions cérébrales correspondantes ($\text{AUC}_{\text{cérébral}}$). La distribution cérébrale a été estimée par le modèle VT-1TC (modèle à 1 compartiment tissulaire), en (B), en utilisant une fonction d'entrée dérivée de l'image. Les données ont également été comparées avec le groupe Sham (pas de FUS, $n=3$). Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm S.D avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

D'autres méthodes de quantification ont été testées afin de réduire la durée de l'acquisition TEP et/ou simplifier l'analyse des données TEP. Les valeurs de $V_{T-1\text{cpt}}$ estimées de 0 à 30 min ($V_{T-1\text{cpt } 30\text{min}}$), ainsi que les ratios $\text{AUC}_{\text{cerveau}}/\text{AUC}_{\text{sang}}$ mesurés de 0 à 30 ou à 60 minutes, étaient significativement corrélée aux valeurs de $V_{T-1\text{cpt } 60\text{min}}$ ($p < 0,001$, $R^2 = 0,99$), avec une perte limitée de la sensibilité pour détecter l'augmentation de la distribution cérébrale du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$ induite par le protocole FUS (**Figure 72**). Cependant, une réduction supplémentaire de la longueur de l'acquisition TEP a eu tendance à sous-estimer la distribution cérébrale du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$, ce qui a entraîné une baisse de la sensibilité de la distribution cérébrale du $[^{18}\text{F}]\text{FDS}$, en particulier dans l'hémisphère traité par ultrasons. Néanmoins, l' $\text{AUC}_{\text{cerveau}}/\text{AUC}_{\text{sang}}$ de 0 à 15 min était toujours significativement corrélée aux valeurs $V_{T-1\text{cpt}}$ ($p < 0,001$, $R^2 = 0,94$) mais la pente de la régression linéaire était $< 0,5$.

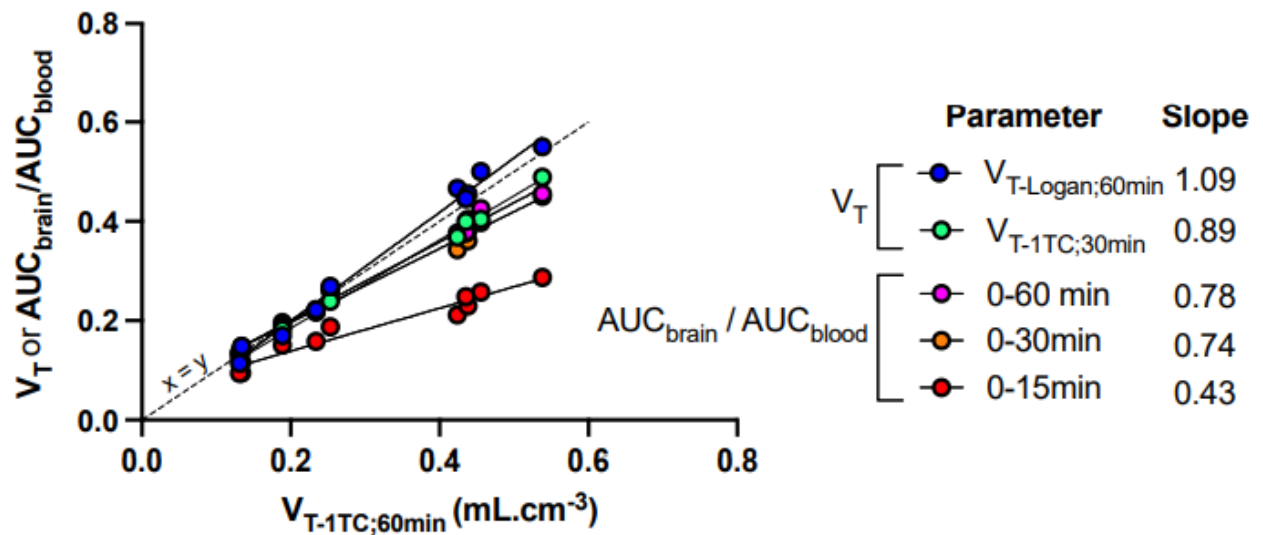


Figure 72: Sensibilité des paramètres cinétiques pour décrire l'impact des US sur la distribution cérébrale du [^{18}F]FDS chez la souris.

Les souris ($n = 5$) ont subi une rupture de la barrière hémato-encéphalique induite par des ultrasons focalisés dans l'hémisphère droit uniquement. Une modélisation cinétique a été réalisée pour estimer la distribution cérébrale (V_T) du [^{18}F]FDS en utilisant un modèle à un seul compartiment tissulaire (V_{T-1cpt}) estimé de 0 à 60 minutes après l'injection de [^{18}F]FDS. Les valeurs $V_{T-1cpt;0-60min}$ ont été corrélées avec les valeurs V_{T-1cpt} estimées de 0 à 30 min. ($V_{T-1cpt;0-30min}$), les V_T estimés à l'aide de la méthode graphique de Logan de 0 à 60 min ($V_{T-Logan;60min}$) ou avec le ratio entre les courbes temps-activité (AUC) mesurées dans les régions cérébrales et dans le sang ($AUC_{cerveau}/AUC_{sang}$) de 0 à 15, 30 ou 60 minutes. La pente de la corrélation linéaire est indiquée.

DISCUSSION

Dans cette étude, l'imagerie TEP au [^{18}F]FDS a été validée pour la première fois en tant que marqueur translationnel et quantitatif de la perméabilité de la BHE afin d'estimer l'impact des FUS sur une zone cérébrale déterminée dans l'espace chez la souris. Comparé au [^{18}F]FDG, le [^{18}F]FDS est peu absorbé par les cellules de mammifères car il ne subit pas de transport facilité (15). L'utilisation du [^{18}F]FDS pour l'imagerie TEP n'est pas nouvelle. En effet, la TEP au [^{18}F]FDS a été validée chez l'animal et l'Homme pour étudier la fonction rénale (18) ou pour estimer la charge bactérienne dans les tissus, sachant que le sorbitol est un substrat métabolique spécifique de certaines souches de bactéries gram-négatives (30). Hormis ces diverses utilisations, à notre connaissance, il n'a jamais été évalué comme un marqueur potentiel de l'intégrité de la BHE. Le [^{18}F]FDS bénéficie des caractéristiques d'un marqueur " idéal " de l'intégrité de la BHE (6). Cela inclut la sécurité clinique, la stabilité métabolique, la faible liaison aux protéines plasmatiques (<0,1 %) et une faible absorption cérébrale basale lorsque la BHE est intacte (16,17). De façon intéressante, il a été démontré que le [^{18}F]FDS s'accumule dans des xénogreffes de tumeurs cérébrales orthotopiques chez la souris, malgré une accumulation négligeable par les cellules de gliome implantées *in vitro* (15). Nos résultats suggèrent que l'augmentation du signal TEP du [^{18}F]FDS dans la zone tumorale dans ce modèle peut être attribuée à une fuite locale de la BHE plutôt qu'à une accumulation par les cellules cancéreuses (15). D'autres expériences sont toutefois nécessaires afin de valider l'utilisation du [^{18}F]FDS pour surveiller quantitativement la perméabilité de la BHE dans les tumeurs cérébrales. En raison de la haute sensibilité de [^{18}F]FDS à l'intégrité BBB, nous pensons que l'utilisation de la TEP au [^{18}F]FDS peut être envisagée pour une estimation correcte de la charge bactérienne dans les lésions cérébrales (31).

La modélisation pharmacocinétique des données TEP du [^{18}F]FDS dans le cerveau est relativement simple. L'estimation du V_T cérébral a donné des résultats similaires et fiables en utilisant soit la méthode graphique (Logan), soit la modélisation compartimentale (1-cpt) dans le cerveau traité et non traité par les FUS, avec une faible variabilité intra-groupe. Dans le groupe FUS, la variabilité était remarquablement plus faible (CV ~10%) dans les régions cérébrales traitées aux FUS par rapport aux régions dont la BHE est intacte (CV ~30%). Cela peut s'expliquer par le faible signal TEP dans le cerveau avec une BHE intacte, associé à un rapport signal/bruit plus élevé par rapport au cerveau soumis aux FUS dans lequel le signal TEP est plus élevé. Cela suggère que le V_T qui prend en compte toute modification de la cinétique plasmatique du [^{18}F]FDS, constitue un paramètre fiable et sensible pour décrire la perméabilité cérébrale au [^{18}F]FDS suite aux FUS.

L'estimation du V_{T-1cpt} à partir des données TEP de 0 à 30 minutes est un compromis permettant une délimitation du pool sanguin au niveau de l'aorte durant les premières minutes post-injection et une estimation correcte de la distribution cérébrale du $[^{18}F]FDS$ tout en réduisant la durée totale de l'acquisition TEP (Figure 72).

D'autres paramètres ont été testés pour estimer quantitativement l'impact des FUS sur la captation cérébrale du $[^{18}F]FDS$. L' $AUC_{cerveau}/AUC_{sang}$, mesurée de 0 à 30 ou 60 minutes après l'injection, a permis de prédire avec précision le V_{T-1cpt} et peut alors être utilisée comme paramètre de substitution pour estimer la perméabilité de la BHE (Figure 72). Il convient d'utiliser le V_T ou l' $AUC_{cerveau}/AUC_{sang}$ plutôt que l' $AUC_{cerveau}$, dans les situations où l'on s'attend à une modification de la cinétique sanguine du $[^{18}F]FDS$, par exemple en cas de troubles rénaux (19). Ces paramètres permettent d'estimer correctement la distribution du $[^{18}F]FDS$.

La méthode FUS utilisée dans ce projet provoque une perturbation localisée de la BHE dans l'hémisphère droit tout en gardant l'hémisphère controlatéral intact, comme le confirme l'utilisation du test d'extravasation de l'EB en post mortem. Dans cette situation, l'hémisphère controlatéral peut servir de région de référence pour estimer avec précision l'impact des FUS sur la fixation cérébrale du $[^{18}F]FDS$ ($AUC_{cerveau}$, (Figure 70)). Cependant, dans de nombreuses situations, la perturbation de la BHE induite par les FUS ou par d'autres méthodes peut affecter l'ensemble du cerveau ou ne peut pas être localisée a priori (32). En l'absence d'une telle région de référence, l'augmentation de la perméabilité de la BHE peut être quantifiée en comparant le V_T du $[^{18}F]FDS$ ou le rapport entre $AUC_{cerveau}/AUC_{sang}$ obtenus avec un groupe contrôle (Sham) où la BHE est intacte ou avec des données TEP d'examens effectués en amont chez les mêmes sujets via des études longitudinales. Cela illustre la valeur ajoutée de la TEP quantitative par rapport à d'autres techniques de neuro-imagerie pour la détermination non invasive de différents niveaux de perméabilité de la BHE dans diverses situations (13). La cartographie de l'augmentation cérébrale du signal TEP du $[^{18}F]FDS$ induit par les FUS était cohérente avec l'extravasation de l'EB observée *ex vivo* et *in vitro*, bien que la corrélation exacte des images TEP avec les coupes de cerveau soit très difficile à établir. Cela suggère qu'il y a une diffusion limitée du $[^{18}F]FDS$ de la zone cérébrale soumise aux FUS vers la zone non traitée ayant une BHE intacte. Il est intéressant de noter que la distribution cérébrale dans la zone traitée par FUS a montré un gradient du centre vers la périphérie (Figure 69). On peut supposer qu'une hétérogénéité de l'intensité des ultrasons délivrés peut se produire à l'intérieur de la zone traitée aux FUS en raison de la perte de transmission des ultrasons par rapport à l'angulation du transducteur à la surface du crâne. Il est intéressant de noter qu'un tel phénomène n'a pas pu être détecté en utilisant des marqueurs de haut poids

moléculaire de l'intégrité de la BHE tels que le gadotérate ou en utilisant l'extravasation d'EB chez les mêmes animaux.

Plusieurs exemples récents illustrent la valeur ajoutée de l'imagerie TEP pour étudier l'impact des FUS sur la structure et la fonction de la BHE *in vivo* (26). Premièrement, la fixation cérébrale du [¹⁸F]FDG, qui est activement transporté par GLUT1, est plus faible lors d'une perturbation de la BHE induite par les FUS. Cette observation correspond à une diminution locale de l'expression des GLUT1 dans le cerveau soumis à la sonication. L'absorption basale du [¹⁸F]FDG et l'expression de GLUT1 ont été complètement rétablies 24 heures après le FUS (33). La glycoprotéine P (P-gp) et la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) sont les principaux transporteurs d'efflux exprimés au niveau de la BHE (1). Précédemment, Goutal et ses collaborateurs ont montré que la perturbation de la BHE induite par les FUS n'avait pas d'impact significatif sur le transport d'efflux du substrat de la P-gp le [¹¹C]N-desméthyl-loperamide et du substrat des P-gp/BCRP le [¹¹C]erlotinib chez les rats (28). Ces sondes TEP particulières peuvent toutefois manquer de sensibilité pour détecter des changements subtils dans la fonction du transporteur (34). Une diminution de l'expression de la P-gp a été signalée 24-48 heures après les FUS (35,36). Cependant, l'impact à long terme sur la fonction de transport d'efflux au niveau de la BHE doit encore être étudié en détail.

Dans ce cadre, le [¹⁸F]FDS peut être un outil quantitatif pour estimer la dynamique de la perturbation et de la restauration de la BHE après un protocole FUS avec une résolution temporelle appropriée (37). Dans l'ensemble, cela suggère que le [¹⁸F]FDS enrichit la boîte à outils de l'imagerie TEP pour étudier l'impact à court et à long terme des FUS sur la perméabilité de la BHE (26).

De plus, la production simple du [¹⁸F]FDS à partir du [¹⁸F]FDG commercial en fait un candidat radiopharmaceutique attrayant pour la détermination de l'intégrité de la BHE par TEP. Le [¹⁸F]FDS n'est pas une préparation " prête à l'injection ", contrairement au [¹⁸F]FDG. Cependant, la plupart des produits radiopharmaceutiques utilisés dans les services de médecine nucléaire et d'imagerie moléculaire doivent être manipulés par une équipe de radiopharmacie, subir une réaction chimique et un contrôle qualité (38). Des efforts sont faits pour développer des kits de formulation pour la radiosynthèse du [¹⁸F]FDS afin de simplifier sa production (39). La radiosynthèse du [¹⁸F]FDS pour une utilisation animale ou clinique peut donc être réalisée dans la plupart des services d'imagerie moléculaire, y compris ceux qui ne sont pas équipés d'installations de radiochimie (31). D'un point de vue clinique, la dosimétrie des rayonnements de ce radiopharmaceutique s'est avérée adaptée à l'utilisation chez l'Homme, bien que l'exposition aux rayonnements puisse constituer une limite à une utilisation répétée (17).

Notre étude présente certaines limites. L'évaluation de l'impact des FUS à l'aide du [¹⁸F]FDS en TEP a été effectuée chez des animaux sains uniquement. Par conséquent, les FUS ont induit une importante augmentation de la pénétration du [¹⁸F]FDS, à partir d'une faible absorption cérébrale basale. Dans cette situation, la significativité statistique a été atteinte en utilisant un petit nombre d'individus. Cependant, un grand nombre de recherches translationnelles montrent que l'intégrité de la BHE est compromise dans de nombreuses pathologies du SNC, comme la sclérose en plaques, les dommages hypoxiques/ischémiques, les lésions traumatiques, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, l'épilepsie et les tumeurs cérébrales (2). De plus, différents modèles non-cliniques ont montré qu'une perte d'intégrité de la BHE est une caractéristique commune de la cascade neuroinflammatoire et contribue aux lésions cérébrales associées à la maladie (4,40). L'imagerie TEP devrait permettre d'avoir un aperçu plus quantitatif sur la perméabilité de la BHE dans de telles conditions pathophysiologiques (4,14). Néanmoins, d'autres expériences sont nécessaires, sur un plus grand nombre d'animaux, pour vérifier si le [¹⁸F]FDS a la sensibilité et la variabilité test-retest appropriées pour être utilisé afin d'étudier la dynamique des changements de la perméabilité de la BHE associés à la maladie lors d'études longitudinales.

Les souris NMRI nu/nu sont largement utilisées comme modèle pour le traitement du cancer, y compris pour des tumeurs cérébrales orthotopiques (41). Nous supposons que l'utilisation d'individus femelles de cette souche de souris immunodéficiente dans la présente étude n'est pas susceptible de biaiser l'impact immédiat de la perturbation de la BHE induite par les FUS par rapport aux souris mâles ou aux souches de souris immunocompétentes. Néanmoins, il a été démontré que l'immunodéficiência améliore l'intégrité de la BHE sur le long terme dans un modèle d'hémorragie intracérébrale (42). Des études longitudinales utilisant l'imagerie TEP quantitative au [¹⁸F]FDS peuvent être utiles pour étudier l'impact du système immunitaire sur la perméabilité de la BHE dans des situations pathophysiologiques en fonction du temps (4). La restauration de la structure et de la fonction de la BHE fait de plus en plus l'objet de recherches comme cible thérapeutique pour prévenir ou limiter l'apparition de troubles neurologiques (43). Inversement, la perturbation temporaire de la BHE induite par les FUS est également considérée comme une stratégie thérapeutique potentielle dans diverses maladies du SNC.

Les FUS offrent des perspectives uniques pour induire une perturbation sûre, reproductible et localisée de la BHE *in vivo* (44). L'ouverture de la BHE induite par les FUS améliore l'administration de médicaments dans le SNC (23,45). L'application des FUS uniquement (sans combinaison avec des thérapies) peut également donner des résultats thérapeutiques en réduisant la charge amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (46) ou induire la neurogenèse (47). La

perturbation de la BHE induite par les FUS est actuellement à l'étude pour le traitement de plusieurs maladies, notamment le glioblastome, les maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique) ou les maladies génétiques (24,48–50). Plus de 30 essais cliniques sont en cours (51–54).

On peut donc s'interroger sur l'impact à long terme de la perturbation temporaire de la BHE induite par les FUS dans une situation où l'intégrité et la fonction de la BHE sont déjà compromises (40). Cette situation complexe illustre le besoin crucial de techniques d'imagerie TEP quantitative pour démêler l'impact des FUS sur la perméabilité de la BHE en relation avec la fonction cérébrale chez les modèles animaux et les patients (26).

CONCLUSION

L'imagerie TEP *in vivo* au [¹⁸F]FDS présente des propriétés essentielles pour devenir un marqueur efficace et quantitatif de la perméabilité de la BHE, notamment une production simple à partir du [¹⁸F]FDG, un faible poids moléculaire, une faible distribution à travers la BHE intacte et une faible diffusion de la zone cérébrale traitée vers les zones non soumises aux FUS avec une BHE intacte. C'est ce que nous démontrons ici pour la première fois en utilisant l'induction locale de la perméabilité de la BHE par les FUS. La TEP au [¹⁸F]FDS offre un marqueur d'imagerie *in vivo* pour mesurer finement et dynamiquement les variations de perméabilité de la BHE. La faisabilité pratique de la TEP au [¹⁸F]FDS pour les protocoles précliniques à cliniques en fait une alternative attrayante à l'IRM-DCE et à la TEMP au 99mTc-DTPA.

RÉFÉRENCES

1. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* janv 2010;37(1):13-25.
2. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 18 nov 2020;17(1):69.
3. Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun.* 20 déc 2019;10(1):5816.
4. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* déc 2013;19(12):1584-96.
5. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother.* janv 2005;2(1):3-14.
6. Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci.* 2015;9:385.
7. Noorani B, Chowdhury EA, Alqahtani F, Ahn Y, Patel D, Al-Ahmad A, et al. LC-MS/MS-based in vitro and in vivo investigation of blood-brain barrier integrity by simultaneous quantitation of mannitol and sucrose. *Fluids Barriers CNS.* 14 oct 2020;17(1):61.
8. Elschot EP, Backes WH, Postma AA, van Oostenbrugge RJ, Staals J, Rouhl RPW, et al. A Comprehensive View on MRI Techniques for Imaging Blood-Brain Barrier Integrity. *Invest Radiol.* janv 2021;56(1):10-9.
9. Artzi M, Blumenthal DT, Bokstein F, Nadav G, Liberman G, Aizenstein O, et al. Classification of tumor area using combined DCE and DSC MRI in patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* janv 2015;121(2):349-57.
10. Kassner A, Thornhill R. Measuring the integrity of the human blood-brain barrier using magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;686:229-45.
11. Raja R, Rosenberg GA, Caprihan A. MRI measurements of Blood-Brain Barrier function in dementia: A review of recent studies. *Neuropharmacology.* 15 mai 2018;134(Pt B):259-71.
12. Mathur M, Jones JR, Weinreb JC. Gadolinium Deposition and Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Radiologist's Primer. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* févr 2020;40(1):153-62.
13. Tournier N, Comtat C, Lebon V, Gennisson J-L. Challenges and Perspectives of the Hybridization of PET with Functional MRI or Ultrasound for Neuroimaging. *Neuroscience.* 15 oct 2021;474:80-93.
14. Elmaleh D, Shoup T, Bonab A, Takahashi K, Fischman A. Evaluation of 1-deoxy-1-[18F]fluoro-D-mannitol as a brain imaging tracer for measuring osmotic disruption following cancer therapy. *J Nucl Med.* 1 mai 2014;55(supplement 1):1123-1123.
15. Li Z-B, Wu Z, Cao Q, Dick DW, Tseng JR, Gambhir SS, et al. The synthesis of 18F-FDS and its potential application in molecular imaging. *Mol Imaging Biol.* avr 2008;10(2):92-8.
16. Yao S, Xing H, Zhu W, Wu Z, Zhang Y, Ma Y, et al. Infection Imaging With (18)F-FDS and First-in-Human Evaluation. *Nucl Med Biol.* mars 2016;43(3):206-14.

17. Zhu W, Yao S, Xing H, Zhang H, Tai Y-C, Zhang Y, et al. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Enterobacteriaceae-Specific Imaging Probe [(18)F]Fluorodeoxysorbitol Determined by PET/CT in Healthy Human Volunteers. *Mol Imaging Biol.* oct 2016;18(5):782-7.
18. Werner RA, Ordonez AA, Sanchez-Bautista J, Marcus C, Lapa C, Rowe SP, et al. Novel Functional Renal PET Imaging With 18F-FDS in Human Subjects. *Clin Nucl Med.* mai 2019;44(5):410-1.
19. Werner RA, Wakabayashi H, Chen X, Hirano M, Shinaji T, Lapa C, et al. Functional Renal Imaging with 2-Deoxy-2-18F-Fluorosorbitol PET in Rat Models of Renal Disorders. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* mai 2018;59(5):828-32.
20. Terstappen GC, Meyer AH, Bell RD, Zhang W. Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier. *Nat Rev Drug Discov.* mai 2021;20(5):362-83.
21. Chen K-T, Wei K-C, Liu H-L. Theranostic Strategy of Focused Ultrasound Induced Blood-Brain Barrier Opening for CNS Disease Treatment. *Front Pharmacol.* 2019;10:86.
22. Chen K-T, Wei K-C, Liu H-L. Focused Ultrasound Combined with Microbubbles in Central Nervous System Applications. *Pharmaceutics.* 15 juill 2021;13(7):1084.
23. Tran VL, Novell A, Tournier N, Gerstenmayer M, Schweitzer-Chaput A, Mateos C, et al. Impact of blood-brain barrier permeabilization induced by ultrasound associated to microbubbles on the brain delivery and kinetics of cetuximab: An immunoPET study using 89Zr-cetuximab. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 10 déc 2020;328:304-12.
24. Wei K-C, Chu P-C, Wang H-YJ, Huang C-Y, Chen P-Y, Tsai H-C, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study. *PLoS One.* 2013;8(3):e58995.
25. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med.* 15 juin 2016;8(343):343re2.
26. Arif WM, Elsinga PH, Gasca-Salas C, Versluis M, Martínez-Fernández R, Dierckx RAJO, et al. Focused ultrasound for opening blood-brain barrier and drug delivery monitored with positron emission tomography. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 10 août 2020;324:303-16.
27. Felix M-S, Borloz E, Metwally K, Dauba A, Larrat B, Matagne V, et al. Ultrasound-Mediated Blood-Brain Barrier Opening Improves Whole Brain Gene Delivery in Mice. *Pharmaceutics.* 12 août 2021;13(8):1245.
28. Goutal S, Gerstenmayer M, Auvity S, Caillé F, Mériaux S, Buvat I, et al. Physical blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound does not overcome the transporter-mediated efflux of erlotinib. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 déc 2018;292:210-20.
29. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, et al. Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* sept 1990;10(5):740-7.
30. Weinstein EA, Ordonez AA, DeMarco VP, Murawski AM, Pokkali S, MacDonald EM, et al. Imaging Enterobacteriaceae infection in vivo with 18F-fluorodeoxysorbitol positron emission tomography. *Sci Transl Med.* 22 oct 2014;6(259):259ra146.
31. Ordonez AA, Wintaco LM, Mota F, Restrepo AF, Ruiz-Bedoya CA, Reyes CF, et al. Imaging Enterobacteriales infections in patients using pathogen-specific positron emission tomography. *Sci Transl Med.* 14 avr 2021;13(589):eabe9805.
32. Fortin D. Drug Delivery Technology to the CNS in the Treatment of Brain Tumors: The Sherbrooke Experience. *Pharmaceutics.* 27 mai 2019;11(5):E248.

33. Yang F-Y, Chang W-Y, Chen J-C, Lee L-C, Hung Y-S. Quantitative assessment of cerebral glucose metabolic rates after blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound using FDG-MicroPET. *NeuroImage*. 15 avr 2014;90:93-8.
34. Breuil L, Marie S, Goutal S, Auvity S, Truillet C, Saba W, et al. Comparative vulnerability of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: A criterion of choice? *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 9 sept 2021;271678X211045444.
35. Aryal M, Fischer K, Gentile C, Gitto S, Zhang Y-Z, McDannold N. Effects on P-Glycoprotein Expression after Blood-Brain Barrier Disruption Using Focused Ultrasound and Microbubbles. *PLoS One*. 2017;12(1):e0166061.
36. Cho H, Lee H-Y, Han M, Choi J-R, Ahn S, Lee T, et al. Localized Down-regulation of P-glycoprotein by Focused Ultrasound and Microbubbles induced Blood-Brain Barrier Disruption in Rat Brain. *Sci Rep*. 11 août 2016;6:31201.
37. Marty B, Larrat B, Van Landeghem M, Robic C, Robert P, Port M, et al. Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. oct 2012;32(10):1948-58.
38. Drozdovitch V, Brill AB, Callahan RJ, Clanton JA, DePietro A, Goldsmith SJ, et al. Use of radiopharmaceuticals in diagnostic nuclear medicine in the United States: 1960-2010. *Health Phys*. mai 2015;108(5):520-37.
39. Hasegawa K, Koshino K, Higuchi T. Facile synthesis of 2-deoxy-2-[18 F]fluorosorbitol using sodium borohydride on aluminum oxide. *J Label Compd Radiopharm*. janv 2021;64(1):40-6.
40. Al Rihani SB, Darakjian LI, Deodhar M, Dow P, Turgeon J, Michaud V. Disease-Induced Modulation of Drug Transporters at the Blood-Brain Barrier Level. *Int J Mol Sci*. 3 avr 2021;22(7):3742.
41. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 21 déc 2016;65(Suppl 4):S441-53.
42. Zhang X, Liu W, Yuan J, Zhu H, Yang Y, Wen Z, et al. T lymphocytes infiltration promotes blood-brain barrier injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res*. 1 sept 2017;1670:96-105.
43. Li J, Zheng M, Shimoni O, Banks WA, Bush AI, Gamble JR, et al. Development of Novel Therapeutics Targeting the Blood-Brain Barrier: From Barrier to Carrier. *Adv Sci Weinh Baden-Wurtt Ger*. août 2021;8(16):e2101090.
44. Dauba A, Delalande A, Kamimura HAS, Conti A, Larrat B, Tsapis N, et al. Recent Advances on Ultrasound Contrast Agents for Blood-Brain Barrier Opening with Focused Ultrasound. *Pharmaceutics*. 21 nov 2020;12(11):E1125.
45. Alli S, Figueiredo CA, Golbourn B, Sabha N, Wu MY, Bondoc A, et al. Brainstem blood brain barrier disruption using focused ultrasound: A demonstration of feasibility and enhanced doxorubicin delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 juill 2018;281:29-41.
46. Burgess A, Dubey S, Yeung S, Hough O, Eterman N, Aubert I, et al. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology*. déc 2014;273(3):736-45.
47. Mooney SJ, Shah K, Yeung S, Burgess A, Aubert I, Hynynen K. Focused Ultrasound-Induced Neurogenesis Requires an Increase in Blood-Brain Barrier Permeability. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159892.
48. Weber-Adrian D, Kofoed RH, Chan JWY, Silburt J, Noroozian Z, Kügler S, et al. Strategy to enhance transgene expression in proximity of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Theranostics*. 2019;9(26):8127-37.

49. Felix M-S, Borloz E, Metwally K, Dauba A, Larrat B, Matagne V, et al. Ultrasound-Mediated Blood-Brain Barrier Opening Improves Whole Brain Gene Delivery in Mice. *Pharmaceutics*. 12 août 2021;13(8):1245.
50. Karakatsani ME, Wang S, Samiotaki G, Kugelman T, Olumolade OO, Acosta C, et al. Amelioration of the nigrostriatal pathway facilitated by ultrasound-mediated neurotrophic delivery in early Parkinson's disease. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 juin 2019;303:289-301.
51. Chen K-T, Lin Y-J, Chai W-Y, Lin C-J, Chen P-Y, Huang C-Y, et al. Neuronavigation-guided focused ultrasound (NaviFUS) for transcranial blood-brain barrier opening in recurrent glioblastoma patients: clinical trial protocol. *Ann Transl Med*. juin 2020;8(11):673.
52. Idbaih A, Canney M, Belin L, Desseaux C, Vignot A, Bouchoux G, et al. Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood-Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 juill 2019;25(13):3793-801.
53. Lipsman N, Meng Y, Bethune AJ, Huang Y, Lam B, Masellis M, et al. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun*. 25 juill 2018;9(1):2336.
54. Mainprize T, Lipsman N, Huang Y, Meng Y, Bethune A, Ironside S, et al. Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. *Sci Rep*. 23 janv 2019;9(1):321.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'imagerie TEP au cours de cette thèse a permis de suivre *in vivo* l'évolution de différents mécanismes cérébraux tels que la neuroinflammation, le métabolisme du glucose et l'intégrité de la BHE.

A ma connaissance très peu d'études TEP ont été réalisées pour suivre l'évolution de la neuroinflammation suite à une intoxication à un OP (1,2). Cependant, de plus en plus d'études relient la neuroinflammation comme étant un élément participant aux troubles cognitifs qui s'installent sur le long terme post-exposition à des neurotoxiques. (3). Cette première approche en imagerie *in vivo* pour un suivi d'une neuroinflammation à des doses sous léthales de neurotoxique est primordiale pour comprendre l'impact de ces doses au niveau cérébral. Mon étude préclinique est la troisième en imagerie TEP *in vivo* et la première investiguant l'impact de doses sous léthales de neurotoxique (NIMP) sur le cerveau. Dans le cadre du suivi de l'évolution de la neuroinflammation grâce à l'utilisation du [¹⁸F]DPA-714 dans un modèle d'intoxication avec un organophosphoré (NIMP) (4), mon étude a mis en avant une fenêtre thérapeutique d'action suite à une exposition à une faible dose de toxique. En effet, notre approche en imagerie a également permis de suivre une réponse thérapeutique suite à l'utilisation d'un anti-inflammatoire (le Montelukast) déjà prescrit dans la pathologie asthmatique. Son utilisation dans d'autres pathologies comme la maladie de Parkinson et d'Alzheimer, l'épilepsie (5–7) l'a positionné comme une molécule ayant de nombreuses propriétés thérapeutiques en agissant notamment sur les voies inflammatoires. Il a été utilisé pour la première fois dans notre étude dans le cas d'une intoxication et a indiqué une diminution de l'inflammation un mois post-traitement.

Un suivi thérapeutique a également pu être effectué dans un modèle murin d'une pathologie neurodégénérative très fréquente dans nos sociétés : la maladie d'Alzheimer. Cette étude TEP [¹⁸F]FDG a mis en évidence une diminution de la consommation de glucose dans un modèle d'injection intra-cérébroventriculaire du peptide A β ₂₅₋₃₅ (8) grâce à une approche par cartographie statistique paramétrique. Il est intéressant de noter que des divergences ont été décrites dans la littérature concernant les résultats obtenus en préclinique sur la consommation de glucose dans les modèles de la MA (9). Cependant, nos résultats correspondent aux études cliniques démontrant un hypométabolisme du glucose chez les patients Alzheimer (10). Le métabolisme du glucose a pu être rétabli après un traitement au Donépézil dans ce modèle murin. Ce traitement est déjà utilisé chez l'Homme depuis plusieurs années dans le traitement

symptomatique de la MA (11). Cependant, l'évaluation de son effet thérapeutique a été évalué pour la première fois dans ce modèle murin. D'autres approches thérapeutiques pourraient être testées dans ce modèle afin d'étudier des améliorations du fonctionnement cérébral suite à l'étude du métabolisme du glucose *in vivo*.

Que ce soit dans le cadre de la MA ou d'une intoxication, l'étude de l'intégrité de la BHE est importante afin de comprendre sa dynamique dans un contexte pathologique. D'un côté, son étanchéité empêche le passage de molécules thérapeutiques tels que les oximes permettant de réactiver les AChE inhibées dans le cadre d'une intoxication (12) ou de thérapies innovantes dans la MA (13). D'un autre côté, la BHE peut être altérée dans ces deux états pathologiques : intoxication ou MA (14,15). Par conséquent, l'étude de l'étanchéité de la BHE *in vivo* via des approches quantitatives pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution dynamique de cette dernière évaluant à la fois son altération et/ou sa restauration. Pour cela des biomarqueurs quantitatifs sont nécessaires. Ma troisième étude a permis de repositionner l'imagerie TEP au [¹⁸F]FDS comme marqueur de l'intégrité de la BHE. Ce radiotracer est déjà utilisé pour des pathologies néphrologiques ou lors d'infections bactériennes (16,17). Pour investiguer l'utilité de la TEP au [¹⁸F]FDS dans le cadre de l'intégrité de la BHE, des souches de souris saines ont été utilisées et une ouverture focalisée de la BHE côté hémisphérique droit a été réalisée grâce à la technologie des ultrasons préalablement utilisée dans notre laboratoire (18). L'augmentation de la fixation du [¹⁸F]FDS uniquement au niveau de la zone soumise aux FUS a montré que ce radiotracer était sensible aux modifications de la perméabilité de la BHE. Cette étude a permis de valider le [¹⁸F]FDS comme biomarqueur TEP de l'intégrité de la BHE. Dès lors, son utilisation pourrait investiguer l'ouverture « naturelle » de la BHE suite aux processus pathologiques qui peuvent l'impacter dans diverses pathologies neurologiques. Cela permettra de déterminer des fenêtres thérapeutiques d'actions pour l'administration de thérapeutiques pouvant ainsi accéder aux sites cérébraux lésés. Etant donné la diversité des modifications que peut subir la BHE à des fenêtres temporelles individu dépendant, des approches interventionnelles utilisant la technologie des ultrasons focalisés (FUS) sont primordiales pour engendrer artificiellement l'ouverture de la BHE *in vivo* (19). La combinaison FUS/[¹⁸F]FDS utilisable en imagerie TEP offre alors de nouvelles perspectives pour la mise au point de divers protocole FUS afin d'optimiser leurs actions au sein du SNC.

Finalement, l'utilisation de trois radiotraceurs TEP [¹⁸F]DPA-714 (activation gliale), [¹⁸F]FDG (consommation de glucose) et [¹⁸F]FDS (intégrité de la BHE) dans différents modèles précliniques

(OP, MA, FUS) m'a permis d'investiguer, durant ma thèse, de divers mécanismes cérébraux *in vivo* dans des contextes pathologiques ou non.

RÉFÉRENCES

1. Flannery BM, Bruun DA, Rowland DJ, Banks CN, Austin AT, Kukis DL, et al. Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J Neuroinflammation*. 12 oct 2016;13(1):267.
2. Hobson BA, Rowland DJ, Sisó S, Guignet MA, Harmany ZT, Bandara SB, et al. TSPO PET Using [18F]PBR111 Reveals Persistent Neuroinflammation Following Acute Diisopropylfluorophosphate Intoxication in the Rat. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 1 août 2019;170(2):330-44.
3. Andrew PM, Lein PJ. Neuroinflammation as a Therapeutic Target for Mitigating the Long-Term Consequences of Acute Organophosphate Intoxication. *Front Pharmacol*. 2021;12:674325.
4. Angrand L, Takillah S, Malissin I, Berriche A, Cervera C, Bel R, et al. Persistent brainwave disruption and cognitive impairment induced by acute sarin surrogate sub-lethal dose exposure. *Toxicology*. 30 mai 2021;456:152787.
5. Mansour RM, Ahmed MAE, El-Sahar AE, El Sayed NS. Montelukast attenuates rotenone-induced microglial activation/p38 MAPK expression in rats: Possible role of its antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic effects. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 nov 2018;358:76-85.
6. Fleck J, Temp FR, Marafija JR, Jesse AC, Milanesi LH, Rambo LM, et al. Montelukast reduces seizures in pentylenetetrazol-kindled mice. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2016;49(4):e5031.
7. Lai J, Hu M, Wang H, Hu M, Long Y, Miao M, et al. Montelukast targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 ameliorates A β 1-42-induced memory impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses in mice. *Neuropharmacology*. avr 2014;79:707-14.
8. Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*. 15 janv 1996;706(2):181-93.
9. Bouter C, Bouter Y. 18F-FDG-PET in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Med*. 2019;6:71.
10. Rice L, Bisdas S. The diagnostic value of FDG and amyloid PET in Alzheimer's disease-A systematic review. *Eur J Radiol*. sept 2017;94:16-24.
11. Knowles J. Donepezil in Alzheimer's disease: an evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evid*. 2006;1(3):195-219.
12. Chambers JE, Meek EC, Chambers HW. Novel brain-penetrating oximes for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin and VX surrogates. *Ann N Y Acad Sci*. juin 2016;1374(1):52-8.
13. Wong KH, Riaz MK, Xie Y, Zhang X, Liu Q, Chen H, et al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 17 janv 2019;20(2):E381.
14. Yamazaki Y, Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 13 sept 2017;18(9):E1965.
15. Abdel-Rahman A, Shetty AK, Abou-Donia MB. Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose-response relationships. *Neuroscience*. 2002;113(3):721-41.
16. Werner RA, Wakabayashi H, Chen X, Hirano M, Shinaji T, Lapa C, et al. Functional Renal Imaging with 2-Deoxy-2-18F-Fluorosorbitol PET in Rat Models of Renal Disorders. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. mai 2018;59(5):828-32.

17. Weinstein EA, Ordonez AA, DeMarco VP, Murawski AM, Pokkali S, MacDonald EM, et al. Imaging Enterobacteriaceae infection in vivo with ¹⁸F-fluorodeoxyisotonic positron emission tomography. *Sci Transl Med*. 22 oct 2014;6(259):259ra146.
18. Tran VL, Novell A, Tournier N, Gerstenmayer M, Schweitzer-Chaput A, Mateos C, et al. Impact of blood-brain barrier permeabilization induced by ultrasound associated to microbubbles on the brain delivery and kinetics of cetuximab: An immunoPET study using ⁸⁹Zr-cetuximab. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 déc 2020;328:304-12.
19. Chen K-T, Wei K-C, Liu H-L. Theranostic Strategy of Focused Ultrasound Induced Blood-Brain Barrier Opening for CNS Disease Treatment. *Front Pharmacol*. 2019;10:86.

Titre : Impact de l'exposition aux inhibiteurs réversibles (Donépézil) et irréversibles (l'organophosphoré NIMP) des acétylcholinestérases sur les mécanismes cérébraux étudié par imagerie moléculaire.

Mots clés : inhibiteurs des acétylcholinestérases ; imagerie moléculaire (TEP) ; Neuroinflammation ; Organophosphoré (NIMP) ; Métabolisme du glucose ; Barrière hémato-encéphalique

Résumé: Les acétylcholinestérases (AChE) sont des enzymes largement distribuées au sein du système nerveux central (SNC) permettant le recyclage de l'acétylcholine (ACh). L'utilisation des inhibiteurs réversibles/irréversibles de ces dernières empêchent la dégradation de l'ACh. Suivant le contexte d'utilisation, les inhibiteurs des AChE peuvent avoir un impact bénéfique ou néfaste sur les mécanismes cérébraux. Ces dernières décennies, une classe d'inhibiteurs irréversibles des AChE considérés comme des neurotoxiques de guerre tel que le gaz sarin ont été utilisés lors de divers conflits militaires et/ou lors d'attaques ciblant les populations civiles. Ils provoquent une accumulation anormalement élevée d'ACh au niveau du SNC des personnes exposées avec ces composés, on parlera alors d'intoxication. L'hyperexcitabilité du SNC suite à l'intoxication engendre une succession de symptômes détectables soit sur le court ou le long terme selon la dose de toxique à laquelle les personnes ont été exposées. Des études suite aux attentats de Tokyo en 1995 ont mis en évidence que même une faible dose de toxique ne provoquant pas l'apparition de symptômes immédiats était capable de générer des troubles cognitifs notamment mnésiques des années post-exposition. Cependant les mécanismes sous-jacents à de tels troubles restent encore méconnus. L'utilisation des inhibiteurs d'AChE est aussi possible dans un contexte thérapeutique, comme dans la maladie d'Alzheimer où une diminution des taux d'ACh est observée. Des inhibiteurs cette fois-ci réversibles des AChE comme le Donépézil (DPZ) sont alors utilisés pour maintenir des taux normaux d'ACh dans le cerveau permettant ainsi son bon fonctionnement. Les

études réalisées au cours de cette thèse ont pour but de déterminer l'effet de ces inhibiteurs d'AChE sur divers mécanismes cérébraux. La première étude a permis d'analyser l'impact de l'administration d'une forte et d'une faible dose d'un organophosphoré (NIMP ; analogue du gaz sarin), un inhibiteur irréversible des AChE, sur la neuroinflammation en imagerie TEP *in vivo* via l'utilisation du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$. Le suivi de la neuroinflammation *in vivo* sur plusieurs mois a permis de déterminer une fenêtre thérapeutique d'action pour tester un traitement neuroprotecteur. Pour la deuxième étude un modèle préclinique de la maladie d'Alzheimer (MA) a été employé afin d'évaluer *in vivo* les effets d'un traitement avec le Donépézil sur le métabolisme cérébral du glucose en utilisant l'imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Divers mécanismes pathophysiologiques (neuroinflammation, accumulation anormale de protéines mal conformées (MA)...) sont associés aux maladies neurologiques et peuvent impacter l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique (BHE). Il est donc primordial d'avoir des outils permettant la quantification de la perméabilité de la BHE *in vivo*. Dans ce cadre, un troisième projet utilisant la technique des ultrasons focalisés mis au point au laboratoire a permis de repositionner l'imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]\text{-2-fluoro-2-désoxy-sorbitol}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FDS}$) comme biomarqueur quantitatif de l'intégrité de la BHE *in vivo*. Au cours de cette thèse l'imagerie TEP a permis d'investiguer différents fonctionnalités cérébrales (neuroinflammation, métabolisme cérébral du glucose, intégrité de la BHE) afin de i) réaliser un suivi longitudinal, ii) un suivi thérapeutique et iii) valider un nouveau biomarqueur.

Title: Impact of reversible (Donepezil) and irreversible (the organophosphate NIMP) acetylcholinesterase inhibitors on brain mechanisms investigated by molecular imaging.

Keywords: Acetylcholinesterase inhibitors; molecular imaging (PET); Neuroinflammation; Organophosphate (NIMP); Glucose metabolism; Blood Brain Barrier

Abstract: Acetylcholinesterases (AChE) are enzymes widely spread in the central nervous system (CNS) that allow the recycling of acetylcholine (ACh). The use of reversible/irreversible inhibitors of these enzymes prevents the degradation of ACh. Depending on the context of their use, AChE inhibitors can have a beneficial or detrimental impact on brain mechanisms. In the last decades, a class of irreversible AChE inhibitors considered as warfare nerve agents such as sarin have been used in various military conflicts and/or in several attacks against civilian populations. They cause an excessive accumulation of ACh in the SNC of people who have been exposed to them, which is considered as intoxication. The hyperexcitability of the CNS following intoxication generates a succession of symptoms that can be detected either in the short or long term, depending on the dose of the nerve agent. Studies following the Tokyo attacks in 1995 showed that even a low dose of toxic that did not cause the emergence of immediate symptoms was able to induce cognitive disorders, particularly memory impairment, several years after exposure. However, the mechanisms underlying such disorders are still not well understood. AChE can also be used in a therapeutic context, like in Alzheimer's disease, in which a decrease in ACh levels are observed. Therefore, reversible AChE inhibitors such as Donepezil (DPZ) are used to maintain normal levels of ACh in the brain, thus allowing a proper

brain functioning. The studies carried out in this thesis aimed to determine the effect of these AChE inhibitors on various brain mechanisms. The first study investigated the impact of high and low dose administration of an organophosphate (NIMP; analogue of sarin), an irreversible AChE inhibitor, on neuroinflammation using *in vivo* [¹⁸F]DPA-714 PET imaging. Longitudinal *in vivo* monitoring of neuroinflammation over several months allowed to identify a therapeutic window for neuroprotective treatment. For the second study a preclinical model of Alzheimer's disease (AD) was employed in order to evaluate *in vivo* the effects of Donepezil treatment on cerebral glucose metabolism using [¹⁸F]FDG PET. Various pathophysiological mechanisms (neuroinflammation, abnormal accumulation of misfolded proteins (AD)...) are associated with neurological diseases and may impact the blood-brain barrier (BBB) integrity. It is therefore essential to develop tools to quantify BBB permeability *in vivo*. In this context, a third project combining focused ultrasound and PET was set up in order to investigate the potential of [¹⁸F]FDS PET imaging as a quantitative biomarker of BBB integrity *in vivo*. In the course of this thesis, PET imaging allowed to investigate different brain functions (neuroinflammation, cerebral glucose metabolism, integrity of the BBB) in order to assess i) changes in brain mechanisms in a longitudinal manner, ii) a therapeutic follow-up and iii) validate a new biomarker