HAL
open science

Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : couplage de la β-MicroProbe aux techniques magnétiques etdéveloppement de fantômes de rat et de souris voxelisés

Aurélie Desbrée

To cite this version:

Aurélie Desbrée. Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : couplage de la β-MicroProbe aux techniques magnétiques etdéveloppement de fantômes de rat et de souris voxelisés. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT : . tel-00115911

HAL Id: tel-00115911

https://theses.hal.science/tel-00115911

Submitted on 24 Nov 2006

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

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

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VII

Spécialité: ***Interfaces Physique Biologie***

par

Aurélie DESBREE

Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études *in vivo* chez le petit animal :

couplage de la β-MicroProbe aux techniques magnétiques et développement de fantômes de rat et de souris voxelisés

soutenue le 27 septembre 2005

Composition du jury:

M. Philippe SCHWEMLING	*Président*
M. Serge GOLDMAN	*Rapporteur*
M. Philippe MANGEOT	*Rapporteur*
M. Luc VALENTIN	*Directeur de thèse*
M. Christian MOREL	*Examinateur*
M. Philippe HANTRAYE	*Examinateur*
M. Philippe LANIECE	*Directeur de thèse*

Table des matières

Introduction **1**

Chapitre I -- Couplage des techniques d'investigation *in vivo* chez le petit animal: états des lieux **4**

I Propriétés des techniques d'imagerie 5
I. 1 Imagerie X 5
I. 2 Techniques nucléaires 7
I. 3 Techniques magnétiques 16
I. 4 Imagerie ultrasonore 20
I. 5 Imagerie optique 21
I. 6 Discussion : synthèse sur les différentes modalités d'imagerie dédiées au petit animal 23
II Multimodalité: couplage des techniques 24
II. 1 Couplage du microCT et des techniques nucléaires 25
II. 2 Couplage des techniques nucléaires et des techniques optiques 26
II. 3 Couplage des techniques RMN et des techniques nucléaires 27

Références 30

Chapitre II -- Une technique complémentaire à la TEP chez le petit animal: la β-MicroProbe **35**

I Caractéristiques de la β-MicroProbe 36
I. 1 Principe de détection de la β-MicroProbe 36
I. 2 Sensibilité de détection de la β-MicroProbe 37
I. 3 Volume de Détection de la sonde 38
I. 4 Protocole type d'utilisation de la β-MicroProbe dans le cas des études cérébrales pratiquées en mesure aigue 38
II Description de la β-MicroProbe 39
II. 1 Partie implantée : le scintillateur et la fibre claire 40
II. 2 Interface sonde/module de photodétection 42
II. 3 Système de photodétection 42
III Champs d'investigation biologique 43
III. 1 Etudes pharmacocinétiques 43
III. 2 Etudes fonctionnelles : quantification du Métabolisme Energétique Cérébrale chez le rat 47
III. 3 Etudes méthodologiques : mesure de la fonction d'entrée artérielle 50
III. 4 Etudes en cours de réalisation 51
III. 5 Conclusion et perspectives 53

Références 54

Chapitre III -- Couplage de la β-MicroProbe et de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : aspects physiques **56**

I Influence du champ magnétique sur la trajectoire des positons 57
I. 1 Description du programme de simulation Geant4 57
I. 2 Validation du code de simulation Geant4 61
I. 3 Simulation de l'influence de champs magnétiques intenses sur les positons 62
II Détermination du Volume de Détection de la sonde par simulation à 7 Tesla 68
II. 1 Influence du champ magnétique de 7-T sur le VD 68
II. 2 Quantification du VD et VD_{90} à 7-T 69
III Détermination de la sensibilité de détection de la sonde 71
III. 1 Sensibilité de détection obtenue par simulation 71
III. 2 Sensibilité de détection expérimentale 72
IV Quantité de lumière produite sans et avec champ magnétique 75
IV. 1 Spectres de l'énergie déposée dans la sonde obtenus par simulation 75
IV. 2 Evaluation expérimentale des pertes optiques 77
IV. 3 Spectre photoélectronique expérimental avec et sans champ magnétique 81
V Conclusion et perspectives 85

Références 86

Chapitre IV -- Couplage de la β-MicroProbe et de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : aspects biologiques **87**

I Etude du système sérotoninergique 89
I. 1 Le point sur le système sérotoninergique 89
I. 2 Les récepteurs 5-HT_{1A} dans le cadre des études sur la dépression 94
I. 3 Etapes de synthèse et validation du [^{18}F]-MPPF 95
I. 4 L'association [^{18}F]-MPPF et β-MicroProbe : une méthodologie pour quantifier les variations de la transmission sérotoninergique chez le petit animal *in vivo* 96
II Validation expérimentale du couplage β-MicroProbe/IRMa dans le cadre du système sérotoninergique 98
II. 1 Protocole expérimental 98
II. 2 Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF simultanément à l'acquisition des images IRMa 101
II. 3 Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF hors champ et comparaison aux courbes sous champ 103
II. 4 Discussion sur la variabilité interindividuelle des enregistrements 105

III Quantification absolue de la concentration en molécules radiomarquées *in vivo* : nécessité du développement d'un fantôme voxelisé 106
III. 1 Méthodologies développées pour la quantification du signal radioactif 106
III. 2 Résultats dans le cadre des études couplées β-MicroProbe/IRMa 110
III. 3 Optimisation de la quantification du [^{18}F]-MPPF *in vivo* basée sur la répartition des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe 113
IV Conclusion et perspectives 114

Références 117

Chapitre V – Mesure *in vivo* de ligands radiomarquées chez la souris avec la β-MicroProbe **120**

I Adaptation de la β-MicroProbe aux études chez la souris et caractérisation physique des sondes 121
I. 1 Volume de détection des sondes de 250 µm 121
I. 2 Quantité de lumière produite et sensibilité de détection des sondes de 250 µm 122
II Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF chez la souris 125
II. 1 Protocole expérimental pour la mesure du [^{18}F]-MPPF chez la souris 125
II. 2 Mesure du marquage spécifique du [^{18}F]-MPPF chez la souris 128
III Méthodologies pour la quantification du signal radioactif chez la souris 129
IV Conclusion et perspectives 131

Références 133

Conclusion **134**

INTRODUCTION

Que ce soit l'invention du microscope optique, la découverte des rayons X ou de la radioactivité artificielle, le domaine biomédical a souvent bénéficié des découvertes majeures de la physique. C'est en effet en partie à la conception d'instruments spécifiques que l'on doit les avancées récentes sur les connaissances de la structure élémentaire du vivant, du code génétique à la cellule jusqu'aux études de la physiologie intégrée. Ainsi, à toutes ces échelles, des moyens d'observation et d'exploration développés par les physiciens sont devenus incontournables dans le quotidien des biologistes et des médecins.

Dans ce contexte, l'imagerie *in vivo* chez l'animal fait partie des nouvelles méthodes établies conjointement entre physiciens, biologistes et médecins. A la base de ces travaux se trouve la nécessité d'étudier les mécanismes physiopathologiques de maladies humaines reproduits dans des modèles animaux et, plus particulièrement, chez le petit animal de laboratoire. Ainsi, des maladies aussi diverses que le diabète, la myopathie, la schizophrénie, l'Alzheimer ou l'obésité ont pu être reproduits chez le rongeur et particulièrement chez la souris qui est à la base des modèles transgéniques. Cependant, le développement de ces modèles devait trouver son pendant instrumental et méthodologique pour pouvoir enregistrer *in vivo* un maximum de données pertinentes sur l'évolution physiopathologique des systèmes étudiés. Un effort important a donc été initié à partir des années 1990 pour adapter ou développer des systèmes dédiés aux études chez le petit animal, essentiellement, le micro-scanner X, les techniques nucléaires dont le microTEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique et le microTEP (Tomographie par Emission de Positons), les techniques par résonance Magnétique (RMN), l'imagerie ultrasonore et optique.

Actuellement, les collaborations entre physiciens et biologistes permettent d'explorer les modèles animaux avec chaque modalité utilisée de façon isolée. Pour progresser dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques, il reste donc un grand défi technique à relever : l'association des différentes modalités d'imagerie. Les enjeux de ce challenge sont triples : (i) d'une part, donner une référence anatomique à une image fonctionnelle permettant notamment de localiser précisément les anomalies fonctionnelles et lever des ambiguïtés d'interprétation dans l'analyse du signal tout en réglant les nombreux problèmes techniques sous-jacents (recalage des images, compensation du mouvement respiratoire, …); (ii) d'autre part, acquérir simultanément des paramètres biologiques complémentaires *in vivo* sur un même animal et de façon répétée au cours du temps; (iii) enfin, améliorer la quantification absolue du signal puisque, notamment en imagerie nucléaire, la connaissance précise des régions traversées par le rayonnement peut permettre de corriger les effets de volume partiel. Dans le cas de la fusion des systèmes, si l'association du microTEP et du scanner X est sur la voie du succès, l'association particulièrement intéressante du microTEP et des techniques magnétiques reste délicate à réaliser en raison des interférences du haut champ magnétique avec l'électronique et les photodétecteurs.

C'est dans le cadre de ces recherches interdisciplinaires que s'inscrit une large part de ce travail de thèse qui se propose de coupler les techniques magnétiques à une sonde radiosensible, la β-MicroProbe, précédemment développée dans le groupe Interfaces Physique Biologie (IPN Orsay). La β-MicroProbe permet, après implantation *in situ*, de suivre en temps réel la cinétique de molécules marquées à l'aide d'isotopes radioactifs et a été conçue comme une alternative aux mesures TEP chez le petit animal. L'objectif est de

répondre aux deux enjeux précédemment cités, à savoir, obtenir des informations biologiques complémentaires simultanément et réaliser une quantification absolue du signal radioactif enregistré.

Afin de situer le couplage de la β-MicroProbe et de la RMN dans le cadre des études multimodales chez le petit animal, les différentes techniques d'imagerie dédiées à celui-ci seront présentées dans le premier chapitre. Il sera montré en particulier le principe et les applications des diverses modalités. Après avoir présenté les améliorations apportées ainsi que les limitations propres à chacun des détecteurs, l'exposé sera centré sur les couplages réalisés dans ce domaine et les développements en cours.

Le second chapitre sera consacré à une présentation détaillée de la β-MicroProbe, son principe, les choix instrumentaux adoptés ainsi que les éléments théoriques définis pour caractériser ses performances. La description des principales expériences réalisées tant en pharmacologie, que pour des études fonctionnelles ou méthodologiques permettra d'appuyer l'intérêt et le potentiel de la sonde pour les études *in vivo* chez le rat.

La validation physique de la combinaison des deux techniques fera l'objet du chapitre III. Nous y caractériserons d'un point de vue théorique et expérimental l'influence de champs magnétiques intenses rencontrés en imagerie magnétique sur les différents paramètres définissant la sonde, notamment le volume de détection, la sensibilité de détection de la sonde et le rendement lumineux.

La validation biologique du couplage, présentée au chapitre IV, s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherches menées par une équipe du CERMEP (Lyon) étudiant les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et leur rôle dans les mécanismes de dépression à l'aide d'un traceur, le [^{18}F]-MPPF. Ce travail s'effectue également en collaboration avec la plateforme Animage (Lyon) qui dispose d'un microIRM 7-T. Après avoir exposé le contexte biologique et le protocole d'application, nous présenterons les résultats dédiés à l'acquisition simultanée de la pharmacocinétique du [^{18}F]-MPPF et des images IRM anatomiques de l'implantation des sondes. Sur la base des données biologiques obtenues, nous décrirons l'ensemble des méthodologies développées, fondées sur des fantômes voxelisés de rat, dans le but de quantifier de façon absolue la concentration en molécules radiomarquées dans la structure cérébrale d'intérêt.

Comme mentionné précédemment, la souris est devenue un acteur incontournable des modèles génétiquement modifiés. C'est pourquoi un des défis actuels est également de développer des systèmes permettant l'analyse de paramètres biologiques chez la souris. Dans la continuité des travaux initiés chez le rat, le chapitre V sera dédié à l'adaptation de la sonde aux études *in vivo* chez la souris ainsi qu'à la quantification du signal, d'autant plus critique chez la souris de par la taille réduite des structures.

La conclusion de ce mémoire synthétisera les résultats biologiques obtenus et les perspectives concernant la quantification du signal radioactif détecté par la sonde au niveau d'une structure d'intérêt. Nous y exposerons également les orientations biologiques envisagées, mettant en lumière les potentialités du couplage de la β-MicroProbe et des techniques magnétiques chez le rat ainsi que les possibilités d'études *in vivo* chez la souris.

Chapitre I

Couplage des techniques d'investigation *in vivo* chez le petit animal : état des lieux

Depuis une quinzaine d'années, l'émergence des modèles animaux qui miment les maladies humaines (maladies neurodégénératives, désordres neuropsychiatriques, croissance tumorale) a permis de nouvelles approches fondamentales et thérapeutiques de ces maladies. Rats et souris sont devenus des acteurs incontournables de la recherche biomédicale et connaissent une utilisation massive dans des domaines aussi divers que la toxicologie, la pharmacologie, ou bien encore la biologie moléculaire.

Dans ce contexte, le nombre important d'études effectuées sur ces modèles a stimulé le développement de nouvelles techniques d'imagerie adaptées aux contraintes spécifiques des études *in vivo* sur petits animaux [1-3]. Certaines ont résulté de l'adaptation de caméras cliniques, d'autres ont été développés spécifiquement pour les études chez le petit animal. Alors que la plupart d'entre-elles connaissent après 15 ans de recherche une maturité technique qui leur permet un transfert progressif vers l'industrie (c'est le cas des méthodes nucléaires, scanner X, magnétiques et ultra-sonores), d'autres sont encore en émergence et suscitent un avenir prometteur. C'est le cas en particulier des méthodes optiques qui connaissent aujourd'hui une multitude de développements eu égard à leur accessibilité.

Bien que performantes, ces méthodes restent cependant restreintes à un champ d'application limité par leur principe même et ne peuvent apparaître comme l'outil absolu. C'est pourquoi, pour aller plus loin dans la compréhension des processus moléculaires et cellulaires, les recherches actuelles se sont progressivement orientées vers la combinaison de ces techniques, chacune étant capable d'apporter son lot d'informations complémentaires. Ainsi, au travers des avancées récentes de l'imagerie moléculaire (biochimie des marqueurs) et de l'instrumentation multimodale associée, le domaine de l'imagerie moléculaire s'est fortement développé et fait émerger de nouvelles opportunités pour visualiser directement la biologie des organismes vivants.

Ce premier chapitre sera consacré à la présentation des différentes modalités d'imagerie *in vivo* dédiées au petit animal. Après avoir détaillé les propriétés, les atouts et les limites de chacune des techniques, une large partie sera consacrée aux différents couplages effectués ou en développement, à leurs enjeux biologiques et aux différentes approches instrumentales.

I Propriétés des techniques d'imagerie

L'imagerie *in vivo* du petit animal est apparue dans les années 90. Suscitée par l'apparition massive des modèles animaux, elle avait pour premier objectif de mettre à la disposition de la recherche biomédicale des outils compatibles avec les faibles dimensions du petit animal (des rongeurs essentiellement) tout en préservant une sensibilité adéquate. Dans ce contexte, les collaborations initiées entre physiciens, chimistes et biologistes ont été déterminantes et ont abouti durant les 15 dernières années à l'éclosion de dispositifs de hautes performances strictement dédiés au petit animal. Ce premier paragraphe en présente les multiples facettes et expose tour à tour l'imagerie X, les techniques nucléaires TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique et TEP (Tomographie par Emission de Positons), les techniques par résonance magnétique (RMN), l'imagerie optique et l'imagerie ultrasonore. Leurs principes et les principales applications y sont exposés ainsi que leurs performances et limites intrinsèques. La finalité de ce projet étant portée sur le couplage des techniques nucléaires et RMN, les parties les concernant ont été volontairement accentuées.

I. 1 Imagerie X

La micro-tomographie par rayons-X assistée par ordinateur (microCT*) est basée sur la mesure de la densité de rayons X absorbée par les tissus traversés. Chaque tissu a un coefficient d'absorption propre qui dépend de sa densité et de l'énergie du faisceau le traversant (les os, par exemple, ont un coefficient d'absorption beaucoup plus important que les tissus mous). Ainsi, cette technique permet de radiographier l'organe examiné par coupes successives puis, après reconstruction, de visualiser son image tridimensionnelle.

Le premier microCT est le fruit d'une collaboration étroite entre physiciens et biologistes de l'université de Duke (Oak Ridge, USA) et a été réalisé dans le but de comprendre comment les mutations génétiques affectent les caractéristiques anatomiques de leurs nombreuses lignées de souris [4]. Le microCT s'est en effet rapidement imposé comme un outil de choix pour le criblage phénotypique des modèles transgéniques. Aujourd'hui, il s'avère être une modalité d'imagerie très prometteuse comme moyen relativement économique et rapide pour détecter et caractériser les anomalies du squelette [5] et les tumeurs chez les animaux vivants [6]. Il existe d'ores et déjà de nombreux microCT avec des résolutions de l'ordre d'une vingtaine de microns (annoncés jusqu'à 9 μm) pour des durées d'acquisition typiques situées entre 5 et 30 minutes [7]. Plusieurs d'entre eux ont déjà fait l'objet d'une commercialisation (Fig. I.1). Techniquement, l'approche la plus commune consiste à placer l'animal entre une source de rayons X et un détecteur constitué d'un écran de phosphore optiquement couplé à une caméra CCD [6, 8] (Fig. I.2). Ces dernières années, les développements se sont particulièrement focalisés sur l'amélioration de la résolution [7], la diminution du temps d'acquisition ainsi que la correction des artéfacts de mouvement. La géométrie du système a également été modifiée pour placer l'animal horizontalement durant tout le balayage. De grandes avancées dans ce domaine proviennent également des améliorations des algorithmes de reconstruction d'images [6].

* Acronyme anglais pour microComputed Tomography

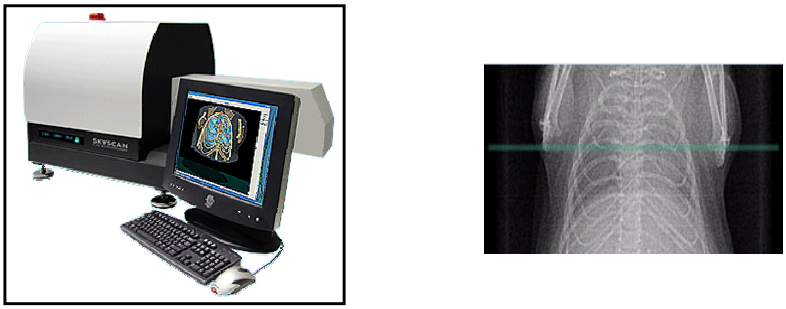


Figure I.1 : *Gauche: image d'un microCT commercial – Droite: poumon de souris acquis par microCT.*

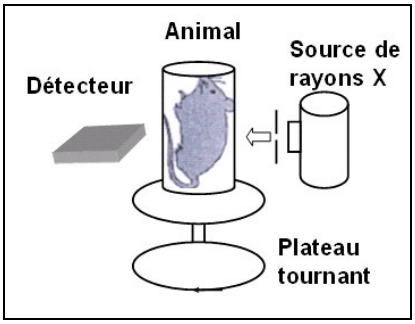


Figure I.2 : *Schéma typique d'un microCT.*

Cependant, le microCT possède l'inconvénient de présenter un contraste peu marqué pour les tissus mous. Pour remédier à cette contrainte, un effort conséquent est porté sur l'administration d'agents de contraste qui sont basés sur leur pouvoir d'atténuation comme l'iode, le baryum, le brome ou le xénon selon le type d'études réalisés [7]. Néanmoins la quantification locale nécessite une concentration relativement importante de ces agents parfois toxiques, ce qui peut entraîner des perturbations physiologiques chez l'animal.

L'un des plus grands challenges pour l'imagerie X concerne la dose élevée reçue par un animal vivant. Ce problème est d'autant plus important lorsqu'on envisage des études de suivi longitudinal sur plusieurs jours/semaines/mois où les animaux doivent être imagés de façon répétée [9]. En effet, il faut savoir que la dose pour laquelle 50% des animaux meurent sous 30 jours pour les souris est de l'ordre de 5 à 7.5 Gy. Les doses inférieures à 1 Gy causent la destruction de globules rouges et produisent des radicaux libres qui peuvent perturber la physiologie normale. Les doses typiques reçues par l'animal pour une seule étude microCT sont de l'ordre de 0.1 à 1 Gy [6]. Tandis qu'une dose de l'ordre de 5 à 200 cGy peut induire une résistance cellulaire aux doses thérapeutiques subséquentes en radiothérapie [10], une dose de 1 à 20 cGy est suffisante pour entraîner des effets thérapeutiques dans certaines souches tumorales [8]. Pour répondre à cette limite, un autre type de scanner X est en émergence basé sur la technologie de pixels hybrides, développés pour l'expérience ATLAS (CERN). Chacun des pixels étant capable de compter indépendamment et un par un les photons qu'il a lui-même sélectionné en énergie durant l'acquisition, l'imageur X sera optimisé pour le contraste, les acquisitions seront plus rapides et permettront en conséquence de réduire les doses délivrées à l'animal [11].

I. 2 Techniques nucléaires

La principale qualité de l'imagerie nucléaire repose sur son excellente sensibilité et sa capacité à délivrer des mesures quantitatives de concentrations de radioactivité incluses profondément dans les tissus.

Les techniques d'imagerie nucléaire sont basées sur la détection de radioisotopes souvent associés à une molécule biologique ou non (acides aminés, anticorps, hormones, cellules, …), ce qui va permettre de suivre une fonction ou une pathologie. La localisation spécifique de ces traceurs (ou radiopharmaceutiques) sur leurs cibles biologiques renseigne sur une fonction biochimique ou physiologique. Les traceurs se diluent dans le flux des autres molécules de l'organisme et, sont détectés grâce au rayonnement qu'ils émettent. Ainsi, la détermination de la concentration locale de radioactivité permet de quantifier la répartition et la cinétique de ces molécules *in vivo*. Cette technique est employée dans des domaines aussi variés que la cancérologie, la neurologie ou la cardiologie. Les deux types d'imagerie nucléaire conçus pour l'imagerie diagnostic chez l'homme, que sont la Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP) et la Tomographie par Emission de Positons (TEP), ont été adaptés pour le petit animal. Après avoir exposé le principe de ces deux types de radioimageurs, les performances et les principales applications de ces techniques nucléaires dédiées seront présentées.

I. 2. 1 Principe de la Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP)

Le principe des systèmes TEMP ou, en anglais, SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), est basé sur la détection de radiotraceurs émetteurs γ ou X à l'aide d'une ou plusieurs caméras. Le radionucléide le plus largement utilisé est le ^{99m}Tc (période T = 6.03 heures, énergie E du γ = 140 keV). L'^{111}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{201}Tl et l'^{131}I sont également communément utilisés en imagerie monophotonique. Les principaux éléments constitutifs d'une γ-gamma caméra classique sont le collimateur, le scintillateur et les photodétecteurs. Le collimateur permet la sélection des émissions gamma issues des molécules radiomarquées selon une direction privilégiée. Seuls les gammas émis dans l'axe des trous du collimateur pourront interagir avec le scintillateur, engendrer un signal lumineux qui atteindra à son tour le détecteur. Ce dernier transforme le flux lumineux en signal électrique analysable. A partir de la détermination de la localisation et de l'intensité obtenues, on peut reconstruire la projection selon un plan de la distribution spatiale du traceur dans la structure visée (Fig. I. 3). Par rotation de multiples têtes de détection autour de l'animal, l'image tomographique finale peut être réalisée.

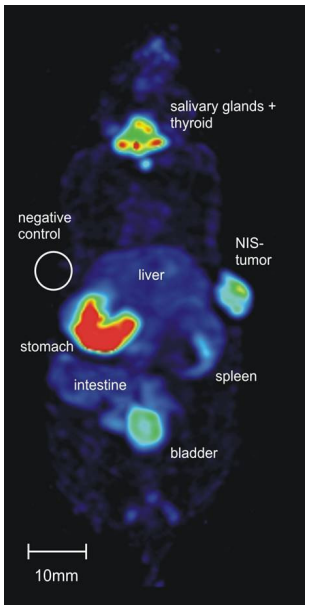


Figure I.3 : *Etude de tumeur chez la souris par microTEMP (1.8 mCi de [^{99m}Tc]-pertechnetate) [12].*

I. 2. 2 Principe de la Tomographie par Emission de Positons (TEP)

Les traceurs employés dans le cas de la TEP (en anglais PET pour Positron Emission Tomography) sont des émetteurs β^+. Les isotopes β^+ les plus couramment employés sont le ^{18}F (T = 109.7 min, E_{max} = 633 keV), le ^{11}C (T = 20.4 min, E_{max} = 960.1 keV) et l'^{15}O (T = 2 min, E_{max} = 1731.8 keV). Le positon issu de la désintégration des radioisotopes parcoure une faible distance dans les tissus, de l'ordre du millimètre, avant de s'annihiler avec un électron du milieu en émettant 2 gammas de 511 keV à environ 180° l'un de l'autre. L'imagerie TEP est basée sur la détection en coïncidence de ces 2 gammas. De par cette propriété, la TEP ne nécessite pas de collimation dite "physique" comme c'est le cas en TEMP. On parle dans ce cas de collimation électronique. Typiquement, les scanners TEP sont constitués d'anneaux de détection dans une géométrie cylindrique permettant d'obtenir simultanément des projections de la distribution en radioactivité selon plusieurs directions différentes. Pour estimer la distribution tridimensionnelle des positions d'annihilation, on fait alors appel à des techniques de reconstruction tomographique (Fig. I. 4). Cependant, l'un des défauts de l'utilisation d'un TEP est la nécessité d'un équipement lourd. De par la durée de vie très courte des émetteurs de positons, il est nécessaire notamment pour le ^{11}C et l'^{15}O de disposer à proximité d'un cyclotron et d'un laboratoire de radiochimie permettant de les produire et de les incorporer dans les molécules que l'on veut suivre.

Figure I.4 : *Gauche : image d'un microTEP – Droite : acquisition microTEP de 10 min (854 μCi ^{18}F-FDG) [Stout D, Crump Institute for Molecular Imaging, LA]. On distingue la vessie et le cœur (myocarde).*

I. 2. 3 Caractéristiques des radioimageurs

Le développement de systèmes TEP et TEMP dédiés au petit animal permet d'effectuer *in vivo* sur modèles animaux des études qualitatives et quantitatives, que l'on réalisait traditionnellement par autoradiographie de façon *ex vivo* [3, 13]. Des améliorations spectaculaires en terme de qualité d'images ont été obtenues ces dernières années par l'utilisation de nouveaux détecteurs et de nouvelles approches de collimation, ainsi qu'en exploitant une configuration plus favorable lié à l'imagerie du petit animal. En effet, comparée à l'imagerie chez l'homme, la diffusion et l'atténuation des photons émis dans les tissus sont moins importantes et un large angle solide pour la détection peut être obtenu avec une relativement petite surface de détecteurs placés près de l'animal. Ceci a permis d'explorer une large palette d'approches technologiques pour les applications en imagerie moléculaire incluant des tubes photomultiplicateurs multicanaux et sensibles à la position [14-17], des détecteurs à semi-conducteurs (photodiodes à avalanches) [18, 19], des scintillateurs rapides dopés au cérium [13-15, 19-24], des détecteurs couplés à des fibres optiques [14, 23, 24], des détecteurs prenant en compte la profondeur d'interaction pour atténuer le problème lié à l'erreur de parallaxe* [22, 25, 26] et des chambres proportionnelles multifils [27, 28]. L'architecture des systèmes a ainsi permis d'obtenir des résolutions spatiales autour de 1.0 mm^3 pour le TEP et le TEMP [24, 27, 29, 30]. Plusieurs sociétés offrent désormais des systèmes TEP et TEMP commerciaux [18, 23, 27, 29]. Nous allons à présent détailler les performances de ces imageurs ainsi que leurs limitations, nous permettant d'introduire les challenges qui "animent la communauté".

A. Performances : sensibilité, efficacité, résolution spatiale et temporelle

Comme nous l'avons déjà mentionné, les techniques d'imagerie nucléaire bénéficient d'une haute sensibilité, de l'ordre de 10^{-11}-10^{-12} mole/L pour l'imagerie TEP [31]. Pour les

* Il apparaît une dégradation de la résolution spatiale aux frontières du champ de vue des détecteurs, dans la mesure où les rayons gamma émis peuvent pénétrer par les côtés des détecteurs dans cette zone, conduisant à un mauvais positionnement du lieu d'émission lors de la reconstruction (cette dernière prend pour origine la face avant des cristaux).

systèmes TEMP, nécessitant une collimation physique, la sensibilité est plus faible (typiquement 10^2 à 10^3 fois moins). Cette haute sensibilité peut permettre l'obtention de mesures quantitatives de faibles concentrations radioactives. L'efficacité de détection reste cependant faible, inférieur à ~5% pour les TEP et de l'ordre de 0.05% pour les TEMP. En effet, l'efficacité est limitée par l'utilisation de méthodes de collimation physique ou électronique qui rejettent un grand nombre d'évènements pour déterminer l'endroit d'émission du rayonnement. Cette faible efficacité a par suite des répercutions sur la résolution temporelle. En effet, pour reconstruire une image avec une statistique satisfaisante, il est nécessaire d'effectuer des acquisitions sur plusieurs minutes ou d'augmenter la dose injectée à l'animal. Il faut donc trouver un compromis pour pouvoir rester en dose traceuse (augmenter la dose injectée revient à augmenter la concentration en molécules radiomarquées dans les tissus), c'est-à-dire injecter une dose suffisamment faible pour ne pas entraîner un effet pharmacologique perturbant le processus étudié [32].

Figure I.5 : *Gauche : image de TOHR – Droite : Vue du collimateur de TOHR.*

Les techniques TEP et TEMP possèdent une relativement faible résolution spatiale, légèrement inférieure à 2 mm. Dans le cas des imageurs TEMP, la résolution spatiale et le signal sur bruit sont généralement dominés par la structure des collimateurs. Les approches traditionnelles consistent à employer des pinholes (collimateur à trou sténopé) limitant néanmoins le champ de vue ou l'efficacité [33]. Certaines techniques de collimation ont spécifiquement été développées pour parvenir à de hautes résolutions et une relativement haute sensibilité [8]. Par exemple, l'imageur TOHR (TOmographe Haute Résolution) développé dans le groupe IPB (Fig. I.5), possède 2 systèmes de collimation : un collimateur physique constitué d'une calotte sphérique percée de trous coniques dont le point focal est le centre de la région d'intérêt et une collimation électronique détectant en coïncidence 2 photons émis par des isotopes tels que l'^{111}In, ^{123}I, ^{125}I [34]. Le principe de scanning du système permet d'obtenir sans reconstruction l'activité présente dans le voxel d'intérêt et d'atteindre une efficacité de 1.6% pour une résolution spatiale de 0.4 mm en coïncidence. Le développement de nouveaux photodétecteurs est également poursuivi par de nombreux groupes. Un système TEMP a été construit sur la base de la détection directe des rayons gammas par un semiconducteur (cadmium zinc telluride) [30]. L'utilisation de caméras Compton, où la direction des gammas incidents est déterminée en utilisant les informations d'énergie et de position de deux couches de détecteurs exploitant les interactions Compton, continue d'être explorée [35].

Dans le cas des imageurs TEP, les systèmes sont encore largement limités par les détecteurs. Il n'existe pour l'instant pas de détecteurs disposant d'une haute efficacité de

détection et ainsi que d'une haute résolution spatiale (localisation des photons d'annihilation de 511 keV inférieure à 1mm) bien que cette performance soit théoriquement possible. Ceci est principalement dû au fait que même si le détecteur est constitué d'un matériau très dense, les photons d'annihilation ont une haute probabilité d'interagir dans le détecteur par effet Compton entraînant une ambiguïté dans la détermination précise du lieu d'annihilation. Avec des détecteurs plus fins, on minimise la diffusion des photons mais au détriment de l'efficacité. De plus, la résolution des systèmes TEP est limitée par des facteurs physiques intrinsèques comme la non-colinéarité des 2 photons de 511 keV qui ne sont pas émis précisément à 180° et le parcours des positons avant annihilation qui dépend des spectres en énergie des positons [33, 36]. Néanmoins, ces facteurs peuvent être modélisés avec une haute précision et être inclus dans les algorithmes de reconstruction pour compenser partiellement leurs effets [37].

Dans ce cadre, l'un des challenges de l'imagerie nucléaire est de réaliser une meilleure quantification. Les corrections d'atténuation et l'estimation des contributions dues à la diffusion peuvent être effectuées par simulation Monte Carlo ou calculs analytiques. De même, l'utilisation de fantômes numériques ou voxelisés représentant de façon réaliste les différentes structures de l'organisme du petit animal pourrait permettre de mieux prendre en compte les diffusions possibles et de réduire les effets de volume partiel *qui limitent l'obtention d'un résultat quantitatif optimal.

B. Principales applications des techniques nucléaires

De par leur principe, les techniques de radioimagerie ne délivrent pas d'images anatomiques. Elles fournissent des données métaboliques à différents niveaux. On peut notamment citer l'imagerie fonctionnelle et oncologique [38, 39], l'évaluation de nouveaux radiopharmaceutiques pour le diagnostic [40], l'évaluation de nouveaux ligands de récepteurs [41], ou plus récemment l'étude de l'expression des gènes [2].

α/ Etudes fonctionnelles

L'un des avantages de l'utilisation des radionucléides est la possibilité, notamment pour le carbone, de marquer le traceur par substitution directe de l'isotope permettant ainsi de suivre ce dernier sans changer ses propriétés biochimiques. Une autre approche particulièrement intéressante est de créer des analogues des molécules que l'on veut suivre en effectuant délibérément des changements chimiques de celles-ci. On peut alors isoler certains chemins métaboliques spécifiques ou piéger le radiotraceur dans les cellules d'intérêt. Par exemple, le [^{18}F]-FDG, un analogue du glucose marqué au ^{18}F, va suivre les mêmes chemins métaboliques qu'une molécule de glucose. Contrairement au glucose qui va subir une cascade de réactions chimiques aboutissant à la production d'énergie utilisable par la cellule,

* L'effet de volume partiel a deux origines : (i) la première est la résolution spatiale limitée des systèmes d'imagerie, qui fait que l'image d'une source ponctuelle est en fait une tâche (la source ponctuelle est en quelque sorte "étalée" par le système d'imagerie, (ii) le second phénomène est l'échantillonnage des images sur une grille de pixels. Au sein d'un pixel, il est possible d'avoir un mélange de plusieurs régions, et le signal alors détecté dans ce pixel sera un mélange du signal provenant de chacune des régions. Ainsi, les biais introduits par l'effet de volume partiel dépendent essentiellement de la résolution spatiale du système d'imagerie, de la taille des pixels, et de la taille des structures imagées.

l'analogue va être bloqué dans sa métabolisation et s'accumuler dans la cellule, reflétant au cours du temps le métabolisme énergétique local [42]. Le [^{18}F]-FDG est également un traceur de choix pour l'étude des modèles de cancer. Les cellules cancéreuses proliférant plus et plus vite que les cellules saines, elles consomment plus de glucose et possède de fait un métabolisme énergétique plus élevé facilement identifiable après injection de [^{18}F]-FDG. Par cette méthode, il est donc possible de suivre l'évolution tumorale et évaluer différentes approches thérapeutiques [43]. Dans le domaine de la cardiologie, les aires myocardiques peuvent être identifiées à l'aide de ce même traceur (Fig. I. 6). Des informations sur l'activité métabolique des régions saines ou nécrosées du cœur peuvent ainsi être obtenues [44]. Enfin citons l'utilisation de l'$H_2{}^{15}O$ à des fins d'imagerie fonctionnelle en neurosciences dont la concentration dans les réseaux sanguins peut renseigner sur le débit sanguin reflétant l'activité fonctionnelle locale [45].

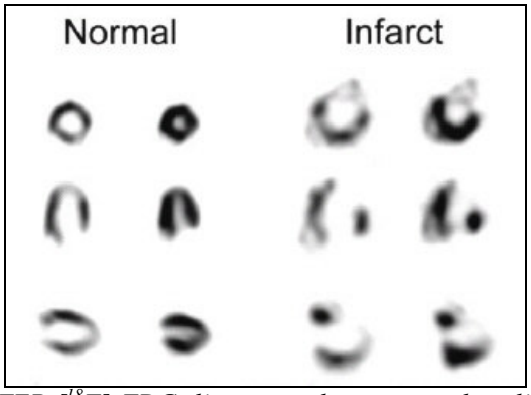


Figure I.6 : *Images microTEP [^{18}F]-FDG d'un cœur de rat normal et d'un rat modèle d'infarctus [44].*

β/ Etudes pharmacologiques

Les techniques nucléaires sont des outils de choix pour les études pharmacologiques* [46, 47]. Les méthodes encore couramment employées dans les laboratoires de biologie consistent à faire des études *ex vivo* pour connaître la répartition et la fixation du traceur. Cette méthode ne donne une information qu'en un seul moment donné. Pour connaître la cinétique du traceur au cours du temps, ces études nécessitent donc le sacrifice de nombreux animaux pour chaque point temporel et un protocole lourd pour le manipulateur. L'intérêt est également de pouvoir suivre un même animal pour suivre l'évolution d'une maladie, caractériser un modèle animal (Fig. I. 7), tester l'efficacité d'un traitement ou explorer de nouvelles voies thérapeutiques.

* Science des médicaments, elle s'intéresse particulièrement à leur formule chimique, à leur mode d'action sur les cellules, à leur circulation dans l'organisme après administration (pharmacocinétique), ainsi qu'à leurs effets sur l'organisme (pharmacodynamie).

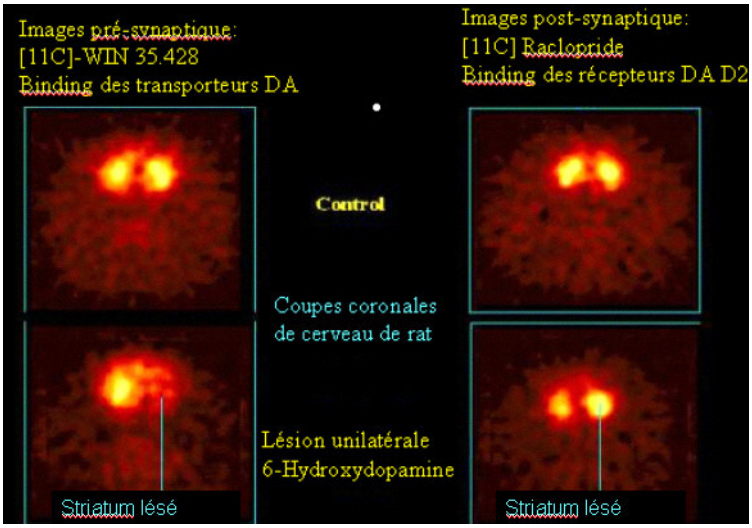


Figure I.7 : *Modèle de neurodégénérescence striatal chez le rat par lésion unilatérale au niveau du striatum.Gauche : Injection d'un traceur spécifique des transporteurs de la dopamine mettant en évidence une diminution de la dopamine dans la région lésée. Droite : Injection d'un traceur spécifique des récepteurs de la dopamine mettant en évidence une augmentation des récepteurs, signe d'une réponse au manque de dopamine dans la région lésée.*

χ/ Etudes de l'expression génique

L'un des grands succès récent des systèmes d'imagerie nucléaire est la visualisation de l'expression génique grâce à l'utilisation ou au développement des gènes rapporteurs dédiés [2, 48, 49]. Les gènes rapporteurs sont des gènes produisant des protéines que l'on peut suivre par les méthodes d'imagerie. Ce gène est placé sous le contrôle du même promoteur que le gène d'intérêt (Fig. I. 8). Lorsque le gène d'intérêt est exprimé, le gène rapporteur est également exprimé et les ARN messagers* (ARNm) correspondant aux deux gènes sont produits proportionnellement. Ainsi, la concentration en protéines produites par le gène rapporteur sera proportionnelle, en l'absence de toutes autres sources codant pour cette protéine, à la concentration en ARNm issus du gène rapporteur et, par conséquent, aussi à la concentration en ARNm issus du gène d'intérêt. En suivant les protéines produites par le gène rapporteur par l'injection d'un substrat radiomarqué spécifique de cette protéine et sa détection par imagerie nucléaire *in vivo*, un signal proportionnel à l'expression du gène d'intérêt peut donc être obtenu.

Cette approche peut être utilisée pour étudier la façon d'importer un gène (virus, liposomes, …) sur un type cellulaire déficient dans la perspective de l'exploiter en thérapie génique. Le gène rapporteur peut également être introduit dans le génome dans un agent infectieux, bactérie ou virus, pour mieux connaître l'infection chez un modèle animal. Enfin, certains gènes d'intérêt spécifiques peuvent être attachés aux gènes rapporteurs chez des animaux transgéniques pour suivre l'expression de ces gènes tout au long de la vie de l'animal.

* Acide RiboNucléique, formé d'une seule chaîne de nucléotides, permettant la synthèse des protéines à partir du programme porté par l'ADN.

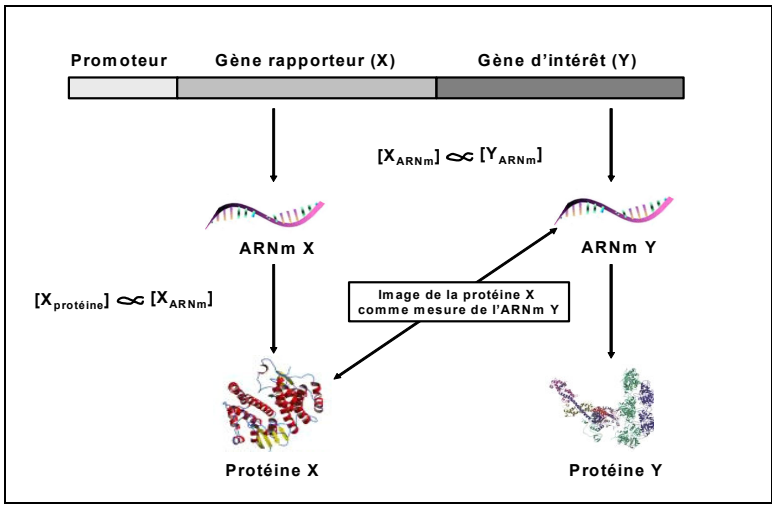


Figure I .8 : *Principe de l'imagerie de l'expression génique in vivo à l'aide des gènes rapporteurs.*

La figure I. 9 montre un exemple très illustratif de cette méthode obtenu à l'aide du microTEP de UCLA [14]. Il s'agit d'une image de souris portant deux tumeurs, chacune exprimant un gène rapporteur différent (D2R à gauche et HSV1–tk à droite). Le premier (D2R) engendre un récepteur tandis que le second (HSV1-tk) produit une enzyme. A deux jours d'intervalle, deux types de molécules marquées au ^{18}F et spécifiques aux deux types de protéines sont injectées à la souris. Dans le premier cas, la molécule injectée est un ligand (FESP) des récepteurs D2R. Dans le second cas, la molécule injectée (FPCV) va être modifiée sous l'action de l'enzyme, issu du gène rapporteur HSV1-tk, et va être piégée au fur et à mesure dans la cellule sous l'action de l'enzyme. L'image qui reflète la distribution des molécules marquées au ^{18}F, montre clairement la spécificité de ces molécules pour chacune des tumeurs. L'ensemble de ces recherches pourront ainsi faciliter la mise au point et le suivi de thérapies géniques chez le petit animal et leurs transferts chez l'homme.

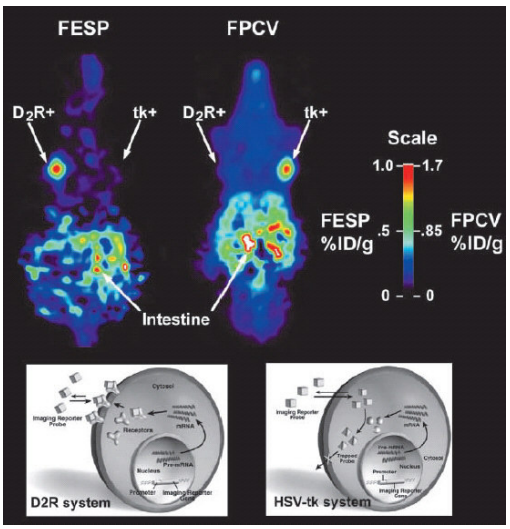


Figure I.9 : *Image d'une souris portant deux tumeurs reflétant chacune l'expression d'un gène rapporteur obtenue par imagerie TEP [S. Gambhir, Crump Inst. for Mol. Imaging, UCLA].*

En conclusion, l'imagerie nucléaire possède 2 atouts majeurs au regard de l'imagerie du petit animal : (i) celui de posséder une sensibilité élevée puisqu'elle donne accès à la quantification de concentrations moléculaires allant jusqu'à 10^{-12} mole/L ; (ii) celui de bénéficier d'une très grande variété de molécules radiomarquées qui permettent de décliner cette technique à de nombreuses applications. Parmi celles-ci, on retiendra plus particulièrement la mesure du métabolisme énergétique grandement exploitée aujourd'hui en oncologie pour sa sensibilité, la mesure pharmacocinétique de molécules d'intérêt ou bien encore celle de l'expression génique. L'imagerie nucléaire présente cependant plusieurs limites intrinsèques liées à la fois à son principe et à sa mise en œuvre. En effet, cette technique ne fournit pas de données anatomiques et possède une résolution spatiale relativement faible au regard des dimensions cellulaires. Ces deux critères associés peuvent générer des ambiguïtés lors de l'interprétation du signal radioactif obtenu en particulier lorsque les tissus et les organes impliqués dans l'élimination du traceur sont adjacents à ceux responsables de la rétention spécifique du traceur. Un effort important est actuellement mené pour endiguer cette contrainte en combinant les méthodes nucléaires à des méthodes plus anatomiques (§ I. 7). Enfin, mentionnons parmi les limites de l'imagerie nucléaire, son coût et sa difficulté de mise en œuvre, en particulier pour la TEP qui nécessite des installations dédiées afin de produire les radioisotopes *in situ* étant donné leur faible période radioactive ainsi que l'implication de rayonnements ionisations.

I. 3 Techniques magnétiques

Les techniques magnétiques sont parmi les technologies les plus avancées pour l'étude chez les petits animaux. En effet, les aimants haut-champ ont été introduits pour l'imagerie du petit animal depuis plusieurs années, parallèlement aux développements entrepris chez l'homme. Cette modalité d'imagerie a trouvé de nombreuses applications et est notamment particulièrement bien adaptée aux études dans le domaine des neurosciences [50].

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou la Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) sont des techniques atraumatiques se fondant sur les principes de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Le principe de la RMN repose sur la détection de signaux issus des propriétés magnétiques des noyaux de spin non nul. Les principaux noyaux d'intérêt biologique possédant ces propriétés magnétiques sont les noyaux d'hydrogène (^{1}H), de l'isotope du carbone (^{13}C), du fluor (^{19}F), du phosphore (^{31}P) et du sodium (^{23}Na). Les applications en imagerie reposent presqu'exclusivement sur l'étude du noyau d'hydrogène. Celui étant en effet contenu dans l'eau, qui constitue les deux tiers des tissus, sa concentration est beaucoup plus élevée que celles des autres atomes. Après avoir présenté le principe de la RMN, nous aborderons les deux types de techniques magnétiques que sont l'IRM et la SRM.

I. 3. 1 Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux d'une substance sous l'action conjointe d'un champ magnétique statique fixe élevé ($\mathbf{B_0}$) et d'une impulsion radiofréquence ($\mathbf{B_1}$). Lorsque l'on soumet les protons (par exemple) au champ magnétique $\mathbf{B_0}$, ceux-ci vont posséder à un mouvement de précession à la fréquence dite fréquence de Larmor autour de l'axe du champ avec apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique **M**. La fréquence de Larmor est située dans le domaine de fréquences radiophoniques. Ainsi, lorsque l'on applique $\mathbf{B_1}$, onde électromagnétique dont la fréquence

est égale à la fréquence de Larmor, le système entre en résonance et le vecteur d'aimantation **M**, tout en continuant à précesser autour de $\mathbf{B_0}$, va se mettre également à précesser autour de $\mathbf{B_1}$. Dès la fin de l'excitation, le proton revient à son état initial d'équilibre avec diminution rapide de la composante transversale (relaxation en T2) et repousse progressive de la composante longitudinale (relaxation en T1) en émettant une onde radiofréquence. Le signal est alors recueilli par une bobine ou antenne de réception, qui le transforme en signal électrique mesurable. Le temps de retour à l'équilibre évoqué dépend de la composition des tissus étudiés. Ainsi, le T1, temps nécessaire pour que la magnétisation longitudinale ait repoussé de 63%, est plus long dans les liquides par rapport aux solides, il est court dans les tissus graisseux. L'ordre de grandeur pour T1 dans les tissus biologiques est de 500 à 1000 ms. Le T2, temps nécessaire pour que la magnétisation transversale ait diminué de 63%, est plus long dans les liquides par rapport aux solides ou par rapport aux tissus constitués de larges molécules. L'ordre de grandeur pour T2 dans les tissus biologiques est de 50 à 100 ms. A ce stade, le signal RMN est une information globale provenant de toutes les parties de l'échantillon.

I. 3. 2 Imagerie par Résonance Magnétique

Pour réaliser des images en résonance magnétique, il est indispensable de pouvoir localiser précisément le signal RMN. En IRM, la localisation spatiale du signal fait appel à l'utilisation de gradients. Les gradients de champs magnétiques réalisent une variation graduelle de champ magnétique dans l'espace, permettant le codage spatial de l'image. Il faut 2 bobines pour produire un gradient de champ magnétique. Ainsi, 3 paires de bobines, une pour chaque orientation de l'espace, se superposent au champ magnétique principal $\mathbf{B_0}$ caractérisant de façon univoque chaque point de l'espace 3D par un champ magnétique B(x, y, z). Le résultat de cette opération est que, en présence de ces gradients de champ magnétique, chaque point du tissu biologique étudié possède sa propre fréquence de Larmor. Il suffira alors d'émettre une onde radiofréquence, dont la fréquence sera ajustée sur la fréquence de Larmor à l'endroit du tissu observé, pour récupérer en retour le signal RMN provenant de cet endroit. En répétant cette opération, en sélectionnant des plans de coupes successifs, on peut reconstruire une image par IRM anatomique (IRMa) de la structure désirée. Les IRM actuels, équipés d'un aimant horizontal, délivrent des images en quelques minutes avec des résolutions spatiales typiques de quelques centaines de microns pour des intensités de champ variant entre 4.7 et 9.4 T (Fig. I. 10 (a)).

Selon le mode d'analyse des signaux IRM, on obtient une information spatiale de très haute résolution permettant de caractériser la forme, le volume ou encore la structure des tissus. L'IRM présente d'ailleurs pour les tissus mous un contraste largement supérieur à celui observé pour l'imagerie X. On peut également acquérir des informations fonctionnelles caractérisant des paramètres physiologiques comme la diffusion de l'eau (IRM de diffusion) [51] ou le taux d'oxygénation du sang (IRM fonctionnelle) [52]. Cette dernière variante s'appuie sur la modification de propriétés magnétiques locales liées au taux d'oxygénation de l'hémoglobine (l'oxyhémoglobine est diamagnétique, la désoxyhémoglobine est paramagnétique) (Fig. I. 10(b)). Lorsque l'on exerce un stimulus cérébral par exemple, l'activation neuronale entraîne une consommation locale d'oxygène et donc une modification de la susceptibilité locale entraînant une variation du signal enregistré. En effectuant une soustraction de l'image au repos par rapport à l'image d'activation, on peut réaliser des cartes d'activation cérébrale avec une résolution temporelle de quelques secondes. Ainsi, ces techniques permettent de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à l'activité neuronale.

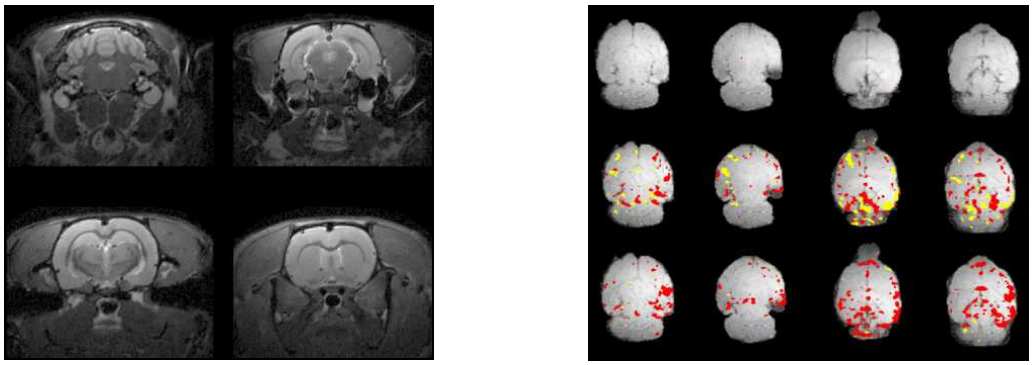


Figure I.10 : *(a) Gauche: coupes de cerveau de rat obtenues par IRM 7 Tesla (117*117*500µm) – (b) Droite: IRMf de l'évolution (haut en bas) de l'épilepsie chez le rat pour différentes coupes (gauche à droite).*

L'IRM est une modalité d'investigation extrêmement riche qui, outre une information anatomique de très haute résolution, permet la mesure de nombreux paramètres physiologiques et connaître les possibles altérations cellulaires ou moléculaires. Cette technique présente cependant une résolution temporelle limitée par sa sensibilité relativement faible (10^{-3}-10^{-5} Moles/L) [31] ainsi qu'un coût élevé. En effet, le signal dépendant de la taille du voxel étudiée, il est nécessaire de faire un compromis entre la durée de l'acquisition et les dimensions des structures sondées afin de conserver une sensibilité de détection raisonnable. Pour compenser la faible sensibilité de la méthode, il est nécessaire de réaliser des mesures sur des volumes relativement importants puisque le caractère dynamique des informations n'est pas compatible avec des temps d'acquisition trop longs. Ainsi, les perspectives de recherche actuelles se concentrent sur le développement des bobines de gradient et de nouveaux aimants très hauts champs dédiés au petit animal, jusqu'à une intensité de 17 T (projet Neurospin, Saint-Aubin, France)[*]. En effet, le rapport signal sur bruit est proportionnel au champ magnétique principal qui doit être le plus homogène possible. Ainsi, plus le champ magnétique est intense, plus la résolution spatiale et temporelle et la sensibilité sont élevées. Cependant, les hauts champs présentent certains inconvénients : diminution du contraste, majoration des artéfacts de mouvement et de susceptibilité magnétique. Un autre travail important est donc également entrepris pour améliorer continuellement les antennes, afin de gagner en sensibilité.

De même, le développement et la caractérisation de molécules exogènes, les agents de contrastes comme le Gadolinium (Gd), permettent d'augmenter significativement la sensibilité de détection. Ces agents de contraste peuvent également être utilisés comme marqueurs de la perfusion, perméabilité et densité vasculaire; le passage dans un capillaire d'un agent paramagnétique modifiant localement le signal du tissu [53]. Une autre méthode consiste à utiliser des ions Mn^{2+} pour suivre les trajectoires de fibres dans le cerveau [54]. L'introduction de gaz d'^{3}He ou de ^{129}Xe hyperpolarisés par des lasers intenses (c'est-à-dire présentant une forte aimantation) offre également la possibilité d'obtenir des images des poumons avec une très bonne résolution [55]. Enfin, l'expression des gènes rapporteurs (cf §I. 2) peut être visualisé par RMN après injection d'un agent de contraste pouvant changer le temps de relaxation du signal RMN sous l'action d'une enzyme [56]. Dans ce cadre, l'utilisation de l'ion paramagnétique Gd^{3+} en est un exemple réussi. Lorsqu'il est injecté, celui-ci est piégé dans un cage moléculaire ne pouvant avoir d'interactions avec les

[*] [http://www.cea.fr/fr/Saclay/actu/img/neurospingb.pdf]

molécules d'eau et indétectable sous cette forme par RMN. Le gène rapporteur produit dans ce cas une enzyme, la β-galactosidase, capable de cliver la cage. L'accès des molécules d'eau aux ions paramagnétiques entraîne un changement local de susceptibilité et du temps de relaxation des protons de l'eau. Ainsi là où l'enzyme est synthétisé, le signal RMN change d'intensité et l'enzyme peut donc être détecté.

I. 3. 3 Spectroscopie par Résonance Magnétique

La SRM est uniquement basée sur l'analyse du signal temporelle RMN, après application d'une transformée de Fourier sur ce dernier. Cela nous permet d'obtenir un spectre qui présente des pics de résonance à des fréquences différentes (Fig. I.11). La décomposition du spectre permet de déterminer la fréquence de résonance de chacun des pics (déplacements chimiques), la largeur du pic à mi-hauteur ainsi que son aire qui correspond au nombre de noyaux étudiés. En fait, les noyaux n'étant pas isolés, mais entourés d'électrons, ces électrons chargés négativement produisent un petit champ magnétique s'opposant à B_0, et créent un écran magnétique autour du noyau. Comme la fréquence de résonance du noyau est directement proportionnelle au champ magnétique local vu par le noyau, celle-ci dépend donc de son environnement électronique et par conséquent moléculaire. Ainsi, on obtient des informations sur la nature et la concentration des espèces moléculaires présentes localement dans la zone étudiée. Cette méthode est notamment un outil de choix pour suivre les processus métaboliques cellulaires. Parmi les noyaux les plus utilisés, on retiendra le ^{1}H, ^{31}P ou le ^{13}C. Le spectre du ^{31}P donne une information directement utilisable, contrairement aux spectres ^{1}H et ^{13}C et est employé par exemple dans le cas de modèles animaux d'hypoglycémie ou d'épilepsie [57]. En effet, pour détecter les métabolites du proton, il faut éliminer le signal de l'eau et des lipides et pour détecter tous les métabolites carbonés, il faut enrichir en ^{13}C, l'abondance naturelle du ^{13}C étant très faible (1.1%). Ainsi, le spectre du ^{13}C permet la mesure de paramètres tels que la vitesse du cycle de Krebs par exemple, par l'intermédiaire de la quantification de certains intermédiaires du cycle [58, 59]. Cependant, la SRM souffre de son manque de sensibilité qui impose des études sur des volumes importants par rapport à la dimension du petit animal (de l'ordre du cm^3). Dans le cas de la spectroscopique, l'application de champs magnétiques plus forts et le développement des antennes de surface permettraient d'apporter une meilleure séparation spectrale et une sensibilité augmentée.

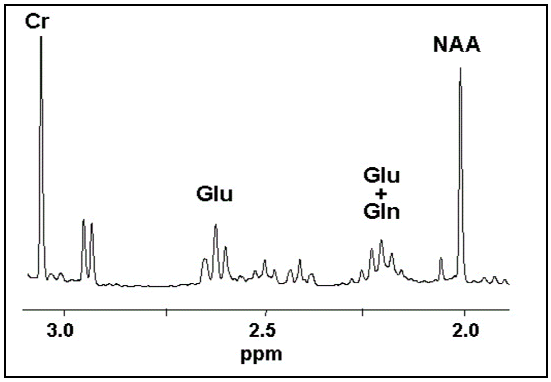


Figure I.11 : *Spectre RMN 1H (300 MHz) d'un extrait de cerveau de rat à PH=1 [59].*

I. 4 Imagerie ultrasonore

Bien que la "communauté de l'imagerie moléculaire" ait portée moins d'attention à l'imagerie ultrasonore qu'aux autres modalités d'imagerie, celle-ci a été adaptée avec succès à l'imagerie du petit animal et possède de nombreux avantages. En effet, c'est une technique d'analyse en temps réel, peu chère, portable, d'une haute résolution spatiale et ne faisant appel à aucun rayonnement ionisant.

Pour l'étude des modèles animaux, l'utilisation de hautes fréquences ultrasonores, de l'ordre de 20 à 60 MHz (contre 2 à 12 MHz chez l'homme), permet l'observation anatomique des tissus situés à environ 5 à 15 mm de profondeur. Ces hautes fréquences sont obtenues grâce au développement de nouveaux transducteurs à base de polymères. Il est à noter que plus la fréquence est importante, plus la profondeur d'analyse est faible mais plus la résolution spatiale est bonne. Ainsi, l'analyse des échos ultrasonores réfléchis par les tissus amène à des résolutions spatiales de l'ordre de quelques µm. Cette très haute résolution spatiale peut notamment donner accès à la visualisation de la souris dès le stade embryonnaire (Fig. I. 12) [60, 61]. On peut en conséquence déterminer le moment précis d'apparitions d'anomalies génétiques [62], le phénotype de certaines souris génétiquement modifiées ne survivant parfois pas jusqu'au terme de la naissance. Une partie des recherches actuelles se concentre sur l'optimisation des transducteurs pour atteindre des fréquences très hautes et par-delà même de meilleures résolutions spatiales.

Au delà de la localisation anatomique, l'imagerie Doppler permet de déterminer des paramètres fonctionnels comme la vitesse et le sens de circulation du sang dans les vaisseaux ou identifier des structures cardiaques [61]. Une large gamme de vitesse peut être observée allant d'une vitesse minimum détectable de l'ordre de 1 mm/s, appropriée aux vitesses de microcirculation sanguine, à des vitesses plus hautes de l'ordre de 30 cm/s pouvant apparaître lors du passage du sang d'une artère à une veine plus petite. Plusieurs sociétés commercialisent aujourd'hui des systèmes d'imagerie ultrasonore dédiés aux rongeurs pouvant combiner les deux fonctionnalités.

Figure I.12 : *Section longitudinale d'un embryon de souris âgé de 13.5 jours montrant le développement des yeux et du cœur.*

L'utilisation d'agents de contraste échographiques apparaît comme l'une des plus grandes innovations. Ceux-ci sont des microbulles de quelques microns de diamètre constituées d'albumine ou d'un lipide et remplies d'un gaz comme le perfluoropropane. En raison des différences de compressibilité et de densité comparées aux tissus environnants, ces microbulles produisent des échos ultrasonores très forts. Sous l'effet des ultrasons, à des

fréquences appropriées, ces bulles peuvent éclater dans un petit volume tissulaire. En complément de l'utilisation des ultrasons couplés aux agents de contraste pour l'imagerie moléculaire, ce phénomène d'éclatement des microbulles gazeuses est particulièrement intéressant pour des applications thérapeutiques [63]. En effet, les perspectives de recherche se tournent vers la fixation de marqueurs spécifiques sur les microbulles pour cibler certains récepteurs spécifiques [64]. En détruisant les microbulles à l'endroit voulu, on a la possibilité de libérer un médicament ou un gène directement au niveau du site choisi [65]. Cependant, la taille de ces agents de contraste n'est pas encore assez bien maîtrisée et peut limiter leurs contrôles. La production de microbulles d'une taille précise permettra de mieux visualiser et détruire de façon quantifiable ces agents.

I. 5 Imagerie optique

Bien qu'ayant émergé récemment chez le petit animal, l'imagerie optique rencontre aujourd'hui un prodigieux succès autour de la communauté de l'imagerie du petit animal. Ceci s'explique en partie par son coût modéré et sa simplicité de mise en œuvre, la détection se faisant généralement par une simple caméra CCD refroidie mais aussi par l'extrême sensibilité qu'elle fournit. Elle possède une résolution temporelle élevée adaptée aux études de phénomènes cinétiques rapides. Néanmoins ces techniques sont limitées aux couches superficielles des tissus du fait de la faible pénétration des photons optiques. On distingue deux mécanismes optiques : la fluorescence et la bioluminescence.

La fluorescence s'appuie sur l'excitation par un laser en général de molécules fluorescentes. Ces molécules peuvent être génétiquement implantées dans une souris, par exemple en incorporant le gène codant pour la protéine fluorescente pouvant être utilisé comme gène rapporteur. La plus connue pour les études optiques *ex vivo*, la Green Fluorescent Protein (GFP), est moins adaptée pour les études *in vivo* de par sa faible longueur d'onde d'excitation (470-490 nm) et d'émission (~510 nm). Néanmoins, la GFP a été employée avec succès en imagerie *in vivo* [66]. D'autres protéines fluorescentes mieux adaptées aux études *in vivo* ont été en conséquence élaborées [8]. Une autre approche consiste à marquer les molécules biologiques d'intérêt par des fluorophores [67], ou plus récemment par des particules fluorescentes connues sous le nom de "quantum dots". Par cette méthode, des concentrations inférieures à la nanomole peuvent être détectées. De même, des concentrations inférieures à la picomole peuvent être atteintes par l'utilisation d'agents spécifiques. Ces agents deviennent fluorescents uniquement lorsqu'ils rencontrent une molécule donnée comme une enzyme d'intérêt. Mais en cas d'absence de l'enzyme, le fluorophore ne s'exprime pas. Ainsi, la lumière de fluorescence produite reflétera l'activité de l'enzyme [68]. Cependant, l'autofluorescence des tissus constitue souvent un bruit de fond qui limite la sensibilité de détection. De plus, à cause de la diffusion importante des photons optiques dans les tissus, ces techniques d'imagerie souffrent d'une analyse quantitative des images extrêmement difficile.

La bioluminescence fait appel à l'introduction de gènes rapporteurs (cf § I. 2) qui codent pour des enzymes dont la plus connue est la luciférase. En présence d'oxygène, d'ATP et d'un substrat préalablement injecté (la luciférine pour la luciférase), la bioluminescence est générée sans qu'une excitation extérieure soit nécessaire. L'enzyme est produite uniquement dans les cellules où s'expriment le gène rapporteur et donc le gène d'intérêt. La figure I. 13 montre l'exemple d'une souris exprimant une tumeur dont les cellules possèdent le gène codant pour la luciférase. Le gène est exprimé lorsque la mort

cellulaire survient, mettant en lumière le phénomène d'apoptose*. Lorsque la souris est traitée par un anti-cancéreux, on note que le signal lumineux produit devient plus important (B), marquant l'efficacité du traitement. En général, le signal généré est faible nécessitant des CCD d'une haute efficacité. En ce sens, la sensibilité de l'imagerie bioluminescente a été significativement améliorée de par les améliorations technologiques des caméras CCD.

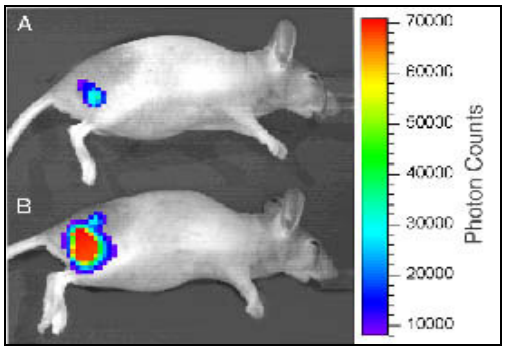


Figure I. 13 : *Image de bioluminescence d'une souris présentant un cancer avant (A) et après traitement (B).*

Des résultats récents proposent de passer d'une simple image 2-D à des images tomographiques permettant d'obtenir des informations sur la distribution tridimensionnelle de la source lumineuse. Des progrès dans ce domaine sont notamment attendus dans une meilleure modélisation de la propagation de la lumière dans les différentes structures tissulaires.

I. 6 Discussion : synthèse sur les différentes modalités d'imagerie dédiées au petit animal

Les différentes modalités d'imagerie pour l'étude *in vivo* chez les petits animaux que nous venons de voir sont toutes basées sur un principe distinct de par la différence de longueur d'ondes des signaux détectés (Fig. I. 14). Leurs performances, paramètres d'acquisition et leurs principales applications sont résumés dans le tableau I. 1. En conséquence, les intérêts ciblés diffèrent selon les techniques.

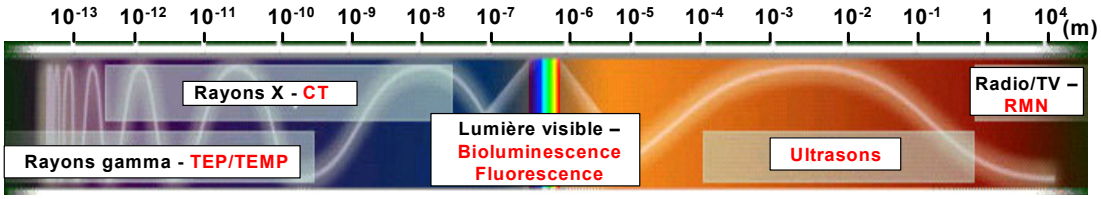


Figure I.14 : *Longueurs d'onde des signaux détectés par les des différents systèmes d'imagerie.*

* Composante normale du développement d'un organisme, qui aboutit à la mort programmée des cellules.

Modalité	Paramètres	Résolution spatiale	Résolution temporelle	Sensibilité (mol/L)	Quantité moléculaire	Applications
Scanner X	Densité, Z	50-200 µm	min	-	-	Anatomie, Milieu contrasté
Ultrason	Impédance acoustique, Vitesse/ Atténuation, Déplacement de fréquences	50-500 µm	s - min	-	µg-mg	Anatomie, Flux sanguin, Caractéristiques de la structure des tissus
TEMP TEP	Concentration radiotraceur	TEMP: 1-2 mm TEP : 1-2 mm	min 10s - min	10^{-10} - 10^{-11} 10^{-11} - 10^{-12}	ng ng	Flux/volume sanguin, Perfusion, Métabolisme, Concentration récepteurs, Expression génique, Suivi thérapeutique
IRM	Concentration ^{1}H Relaxation, Déplacement chimique	0.1 mm	min - heures	10^{-3} - 10^{-5}	µg-mg	Anatomie, Flux sanguin, Concentration/Etat chimique
Optique	Fluorescence Bioluminescence	2-3 mm 3-5 mm	s – min s – min	10^{-9} - 10^{-12} 10^{-15} - 10^{-17}	µg-mg µg-mg	Métabolisme, Récepteurs, Progression tumorale, Expression génique, Suivi thérapeutique

Tableau I.1 : *Résumé des différents paramètres caractérisant les diverses modalités d'imagerie présentées ainsi que leurs principales applications.*

La plupart des modalités d'imagerie biologique sont centrées principalement sur l'acquisition d'informations anatomiques. C'est le cas pour les ultrasons, le scanner X et l'IRMa. Ces modalités parviennent généralement à de très bonnes résolutions spatiales, au-delà du millimètre, ce qui est très important pour obtenir des données sur les caractéristiques structurales des tissus. Les techniques RMN sont capables de fournir des paramètres fonctionnels et biochimiques à travers la mesure des temps de relaxation de l'hydrogène dans les tissus ou par la mesure des déplacements chimiques de pics de résonances résultant de l'environnement chimique des molécules. Cependant, elles souffrent d'une relativement faible sensibilité, de l'ordre d'une dizaine de µmole au plus. Les techniques nucléaires possèdent la sensibilité requise, de l'ordre de la picomole, pour permettre l'étude *in situ* des processus biochimiques et moléculaires sans modifier l'état normal ou pathologique des tissus. Cependant, les techniques basées sur l'émission radioactive sont limitées par une faible résolution spatiale, qui au mieux, atteint le millimètre actuellement.

I. 7 Multimodalité : couplage des techniques

Poussé par l'envie de comprendre et "dénouer" les mécanismes complexes régissant notre organisme, le couplage des modalités s'impose depuis quelques années [69, 70]. Pouvoir suivre plus d'une cible moléculaire, corréler deux signaux en temps et joindre l'anatomique et le fonctionnel, tel est le grand challenge des années à venir chez le petit animal et chez l'homme. Du fait des limitations intrinsèques spatiales et temporelles et des paramètres variés ciblés par chaque technique, un effort important est aujourd'hui porté pour

coupler les méthodes afin d'en faire un seul et unique instrument présentant toutes les performances requises. Cependant, malgré l'attractivité de cette hypothèse de travail, force est de constater l'absence de tels détecteurs en raison de leurs difficultés de mise en oeuvre. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, la communauté a préféré travailler sur des acquisitions séparées et de fusionner par des biais informatiques les images obtenues par les différents imageurs. Cette approche est aujourd'hui largement utilisée pour les études chez l'homme où les données fonctionnelles cérébrales mesurées par TEP ou TEMP sont associées aux images anatomiques générées par IRMa. Pour les autres régions du corps, les recalages sont plus complexes en raison du mouvement des organes et des changements dynamiques et nécessitent des algorithmes sophistiqués. Afin de réduire les problèmes liés aux mouvements, il existe actuellement des systèmes hybrides où le scanner X et le TEP/TEMP sont placés l'un dernière l'autre, un lit commun, où se trouve le patient, se translatant d'un système à l'autre. Dans le cadre de l'imagerie petit animal, ces limitations sont les mêmes avec de plus la problématique de structures bien plus petites entraînant des recalages plus complexes. Bien que ces méthodes permettent des avancées certaines dans le domaine, la solution la plus intéressante et précise est de concevoir des instruments capables d'acquérir des informations de plusieurs modalités en même temps sans déplacer l'animal. Les couplages réalisés et les développements en cours vont à présent être détaillés selon les différentes combinaisons envisagées.

I. 7. 1 Couplage du microCT et des techniques nucléaires

La combinaison la plus explorée est celle du microCT avec soit le microTEP ou le microTEMP. Un exemple de recalage d'images TEMP et microCT obtenu à l'aide de deux systèmes distincts est présenté figure I. 15. D'une part, le couplage permet de recaler des images anatomiques très précises des structures de l'organisme avec des images fonctionnelles de moins bonnes résolutions spatiales et ainsi clarifier la nature d'un processus ou d'une anormalité. En effet, identifier un changement dans une fonction sans connaître précisément sa localisation ou détecter un changement anatomique sans savoir la nature de cette cause peut compromettre un diagnostic fiable. D'autre part, ces couplages permettent d'améliorer la quantification des concentrations en traceur dans les tissus au cours du temps par correction des effets tels que l'atténuation des photons, la diffusion ou les effets de volume partiel.

Pour aider à l'enregistrement et au calibrage des images, des marqueurs ont d'ailleurs été commercialisés (Isotope Products Laboratories). Il s'agit de fantômes de diverses géométries contenant des sources de différentes activités spécifiquement dédiées pour la fusion des images rat ou souris TEP/CT ou TEMP/CT et obtenir des enregistrements plus précis.

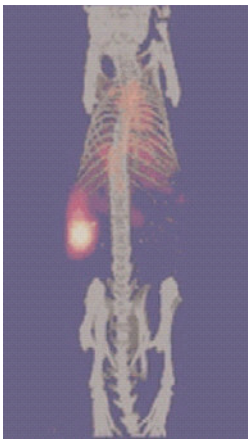


Figure I.15 : *Recalage d'une image TEMP et microCT pour l'étude d'une tumeur chez la souris [Gamma Medica Inc].*

Pour l'instant, la plupart des couplages simultanés TEP/microCT ou Tomographie TEMP/microCT sont encore en phase de développement dans plusieurs groupes et sociétés [69, 71, 72]. Seul un prototype TEP/microCT est arrivé au stade d'une validation biologique *in vivo* chez la souris [73], permettant d'obtenir simultanément la biodistribution d'un traceur et l'image anatomique de la souris correspondante (Fig. I. 16(a)). Les composants du CT et du TEP sont disposés selon une géométrie coplanaire, présentée figure I.16(b). La souris est placée verticalement dans un lit tournant, au centre du dispositif. Ce dernier est composé pour le CT d'un tube X, d'un détecteur X utilisant un flat panel en sélénium et pour le détecteur TEP, de rangées de scintillateurs LSO optiquement couplés à des PS-PMT. D'autres microTEP/microCT combinés sont en cours de développement utilisant d'autres types de technologies [74-76]. Enfin des systèmes alliant les trois modalités microCT et TEP-TEMP sont en développement afin d'obtenir des informations complémentaires sur certains processus complexes [77].

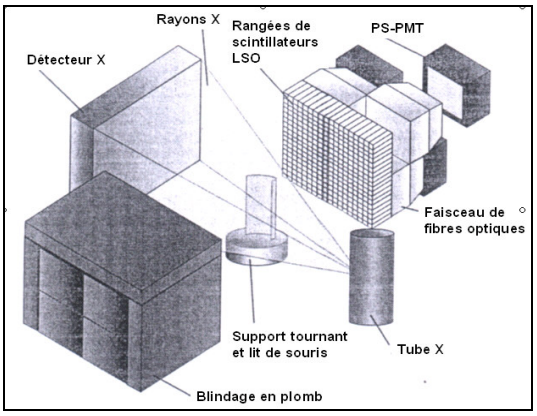


Figure I.16 : *(a) Droite :Coupe sagittal d'une souris 3 h après injection de 26 MBq de 18⁻, un radiotraceur s'accumulant dans les os (400 plans en 38 min) obtenue par un TEP-CT combiné [73]. (b) Diagramme schématique du dispositif expérimental.*

I. 7. 2 Couplage des techniques nucléaires et des techniques optiques

L'avènement des techniques optiques et leur couplage avec les techniques nucléaires sont au commencement de prometteuses avancées, notamment dans le domaine de l'imagerie des gènes rapporteurs chez le petit animal. En effet, le couplage de double gènes rapporteurs et récemment, de triple gènes rapporteurs, codant pour des protéines détectables par la TEP, la bioluminescence et la fluorescence a été effectué [78]. Un seul gène peut ainsi être testé par trois techniques d'imagerie différentes en profitant du bénéfice de chaque modalité (Fig. I. 17).

De nombreux efforts sont également portés sur la conception de détecteurs sensibles à la fois aux photons de 511 keV pour l'imagerie TEP et aux photons optiques d'environ 1 eV pour l'imagerie de fluorescence et de bioluminescence [79, 80]. Des informations nucléaires et optiques pourraient alors être acquises simultanément. La correspondance des données microTEP et des données optiques associées à des simulations du parcours des photons optiques dans les tissus permettra de vérifier la fiabilité de la quantification de la source de bioluminescence et la sensibilité de détection dans les tissus profonds. De même, la combinaison simultanée microTEMP / imagerie optique 3-D de bioluminescence a été entreprise récemment dans la perspective d'offrir une nouvelle méthodologie pour la mesure et l'interprétation de processus biologiques [81].

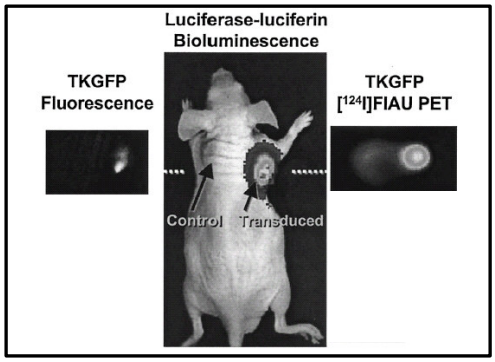


Figure I.17: *Imagerie multimodale de l'expression des gènes rapporteurs par bioluminescence, fluorescence et TEP [78].*

I. 7. 3 Couplage des techniques RMN et des techniques nucléaires

Tout comme le couplage du microCT et des techniques fonctionnelles (optiques, TEP, TEMP), la combinaison de l'IRMa aux techniques nucléaires permet de recaler des images fonctionnelles sur des images anatomiques afin de déterminer précisément la localisation d'une pathologie ou d'une fonction (Fig. I. 18). Ce couplage présente un intérêt fort, notamment en neurobiologie, l'IRMa étant la technique la plus adaptée pour l'imagerie du cerveau de par son contraste marqué entre les différentes structures cérébrales. De plus, les images IRM peut aider à la correction des effets de volume partiel et à la reconstruction d'images TEP.

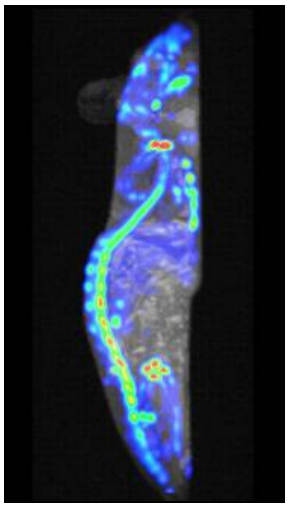


Figure I.18 : *Images TEMP et IRMa fusionnées pour une étude de l'os chez la souris [12].*

L'idée de combiner simultanément les techniques nucléaires et plus particulièrement la TEP aux variantes de la RMN n'est pas nouvelle et stimule la communauté depuis plusieurs années. De précédents articles ont rapporté les avantages théoriques d'un tel couplage [82-84]. En effet, la communauté s'est intéressée au parcours des positons dans un champ magnétique pour améliorer la résolution spatiale des imageurs TEP [85, 86]. Selon ces études, deux avantages sont principalement moteurs pour acquérir des images TEP en présence d'un champ magnétique intense. Le premier est de réduire le flou des images dû au parcours du positon avant son annihilation en diminuant son parcours par la courbure de sa trajectoire dans les directions transverses au champ magnétique. Le second est évidemment d'obtenir simultanément les images TEP et IRM avec un même appareil et s'affranchir des problèmes de recalages d'images en minimisant les problèmes de mouvement et de déformations volumiques des tissus. Un troisième avantage pourrait être ajouté à ce couplage. En effet, au-delà de la localisation anatomique des structures que l'IRMa peut offrir aux mesures nucléaires, plus excitant encore est la possibilité de corréler en temps des données fonctionnelles et biochimiques TEP, IRMf et SRM et d'acquérir *in vivo* des paramètres biochimiques complémentaires simultanément sur un même animal. Les informations obtenues dans le même temps permettraient de valider de façon croisée les deux techniques et, dans le cas où les variations interindividuelles sont importantes, de doubler la statistique pour l'analyse des données sur le même animal. Enfin, la TEP ne distinguant pas les espèces moléculaires auxquelles les radionucléides sont attachés, cet obstacle peut être résolu dans certains cas en combinant TEP et SRM.

Cependant, ce couplage reste particulièrement délicat à obtenir du fait de la difficulté de faire fonctionner à proximité d'un aimant haut champ les chaînes d'acquisition nécessaires aux tomographes. De même, l'introduction d'un scanner TEP dans l'aimant ne doit pas perturber l'homogénéité du champ provoquant des distorsions et artéfacts au niveau des images IRM résultantes. Plusieurs groupes ont rapporté leur progrès dans le domaine [87-89]. Récemment, un prototype prometteur RMN-compatible TEP a été développé capable d'acquérir simultanément des images TEP avec soit l'IRMa ou la SRM [90, 91]. Il consiste en un anneau de scintillateurs placé dans l'aimant dont le couplage aux photodétecteurs est assuré par un guide optique de longue taille constituée essentiellement de fibres optiques. Néanmoins, ce système présente des limitations importantes avec un champ de vue trop petit pour imager un corps entier de rat (25 mm de diamètre), une faible sensibilité et un faible rapport signal sur bruit. Les principales données n'ont pour l'instant pu être réalisées que sur

des fantômes ou des organes isolés [92]. Un scanner TEP plus large est en cours de réalisation. Une approche alternative pourrait être d'utiliser des détecteurs à semi-conducteurs comme les photodiodes à avalanche dont les performances ne semblent pas être dégradées sous haut champ.

Conclusion

La multimodalité est en émergence et devient de plus en plus une méthode de choix pour les études de type moléculaire. L'intégration simultanée de certaines des modalités présentées devient un outil puissant pour obtenir des informations qui ne peuvent pas être obtenues par deux systèmes séparés. Il s'agit d'un continuel challenge pour réussir, à travers les développements technologiques permanents, la réalisation de systèmes combinés, conservant les performances de chacun sans compromis. Nous verrons dans les chapitres suivants, que sur la base du développement d'une sonde radiosensible β-MicroProbe initié par le groupe IPB, nous avons pu répondre à l'une de ses dualités. Le couplage de la β-MicroProbe et de la RMN permet en effet d'obtenir simultanément des informations nucléaires et magnétiques *in vivo* chez le même animal et propose une alternative au couplage TEP/RMN. La β-MicroProbe et les études biologiques réalisées avec celle-ci seront présentées dans le chapitre II. Puis, la faisabilité physique et biologique du couplage sera présentée dans les chapitres III et IV, respectivement.

Références

[1] C. Marriott, J. Cadorette, R. Lecomte, V. Scasnar, J. Rousseau, and J. Van Lier. "High-resolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors" *J Nucl Med*, vol. 35, pp. 1390-6, 1994.

[2] A. Chatziioannou. "Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs" *Eur J Nucl Med*, vol. 29, pp. 98-114, 2002.

[3] S. Cherry and S. Gambhir. "Use of positron emission tomography in animal research" *ILAR J*, vol. 42, pp. 219-232, 2001.

[4] M. Paulus, H. Sari-Sarraf, S. Gleason, M. Bobrek, J. Hicks, and D. Johnson. "A new X-ray Computed Tomography system for laboratory mouse imaging" *IEEE TNS*, vol. 46, pp. 558-564, 1999.

[5] K. Engelke, M. Karolczak, A. Lutz, U. Seibert, S. Schaller, and W. Kalender. "Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure" *Radiologe.*, vol. 39, pp. 203-212, 1999.

[6] M. Paulus, S. Gleason, S. Kennel, P. Hunsicker, and D. Johnson. "High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research" *Neoplasia*, vol. 2, pp. 62-70, 2000.

[7] E. Ritman. "Micro-computed tomography_current status and developments" *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 6, pp. 185-208, 2004.

[8] S. Cherry. "In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics" *Phys Med Biol*, vol. 49, pp. R13-R48, 2004.

[9] J. Boone, O. Velazquez, and S. Cherry. "Small-animal X-ray dose from Micro-CT" *Molecular Imaging*, vol. 3, pp. 149-158, 2004.

[10] G. Raaphorst and S. Boyden. "Adaptative response and its variation in human normal and tumor cells" *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 75, pp. 865-873, 1999.

[11] S. Basolo, J. Berar, A. Bonissent, P. Breugnon, N. Boudet, B. Caillot, J. Clemens, P. Delpierre, B. Dinkespiler, R. Khouri, I. Koudobine, V. Matarazzo, C. Meessen, M. Menouni, C. Morel, C. Mouget, P. Pangaud, F. Peyrin, D. Sappey-Marinier, S. Valton, and E. Vigeolas. "PIXSCAN: CT-Scanner For Small Animal Imaging based on hybrid pixel detectors" *http://www.esrf.fr/Conferences/IWORID7/FinalProgramme/clemens.pdf.*

[12] N. Schramm. "Multi-Pinhole SPECT" *Jülich, Germany*, 2003.

[13] D. Weber and M. Ivanovic. "Ultra-high-resolution imaging of small animals: implications for preclinical and research studies" *J Nucl Cardiol*, vol. 6, pp. 332-344, 1999.

[14] S. Cherry, Y. Shao, R. W. Silverman, A. Chatziioannou, K. Meadors, S. Siegel, A. Boutefnouchet, T. Farquhar, J. Young, W. F. Jones, D. Newport, C. Moyers, M. Andreaco, M. Paulus, D. Binkley, R. Nutt, and M. Phelps. "MicroPET: a high resolution PET scanner for imaging small animals" *IEEE TNS*, vol. 44, pp. 1161-1166, 1997.

[15] R. Miyaoka, S. Kohlmyer, and T. Lewellen. "Performance characteristics of micro crystal element (MICE) detectors" *IEEE TNS*, vol. 48, pp. 1403-1407, 2001.

[16] S. Meikle, P. Kench, A. Weisenberger, R. Wojcik, M. Smith, S. Majewski, S. Eberl, R. Fulton, A. Rosenfeld, and M. Fulham. "A prototype coded aperture detector for small animal SPECT" *IEEE TNS*, vol. 49, 2002.

[17] A. Weisenberger, B. Kross, S. Majewski, R. Wojcik, E. Bradley, and M. Saha. "Design features and performance of a CsI(Na) array based gamma camera for small animal gene research" *IEEE TNS*, vol. 45, pp. 3053-3058, 1998.

[18] R. Lecomte, J. Cadorette, S. Rodrigue, D. Lapointe, D. Rouleau, M. Bentourkia, R. Yao, and P. Msaki. "Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph" *IEEE TNS*, vol. 43, pp. 1952-1957, 1996.

[19] S. Ziegler, B. Pichler, G. Boening, M. Rafecas, W. Pimpl, E. Lorentz, N. Schmitz, and M. Schwaiger. "A prototype high-resolution animal positron tomograph with avalanche photodiode arrays and LSO crystals" *Eur J Nucl Med*, vol. 28, pp. 136-143, 2001.

[20] J. Correia, C. Burnham, D. Kaufman, and A. Fischman. "Development of a small animal PET imaging device with resolution approaching 1 mm" *IEEE TNS*, vol. 46, pp. 631-635, 1999.
[21] A. Del Guerra, G. Di Domenico, M. Scandola, and G. Zavattini. "High spatial resolution small animal YAP-PET" *Nucl. Instrum. Methods A*, vol. 409, pp. 508-510, 1998.
[22] J. Seidel, J. Vacquero, and M. Green. "Resolution uniformity and sensitivity of the NIH ATLAS small animal PET scanner" *IEEE TNS*, vol. 50, pp. 1347-1356, 2003.
[23] Y.-C. Tai, A. Chatziioannou, S. Siegel, J. Young, D. Newport, R. Goble, R. Nutt, and S. Cherry. "Performance evaluation of the microPET P4: a PET system dedicated to animal imaging" *Phys Med Biol*, vol. 46, pp. 1845-1862, 2001.
[24] Y.-C. Tai, A. Chatziioannou, M. Yang, R. Silverman, A. Meadors, S. Siegel, D. Newport, J. Stickel, and S. Cherry. "MicroPET II: design, development and initial performance of an improved microPET scanner for small animal imaging" *Phys Med Biol*, vol. 48, pp. 1519-1537, 2003.
[25] J. Huber and W. Moses. "Conceptual design of a high-sensitivity small animal PET camera with 4 pi coverage" *IEEE TNS*, vol. 46, pp. 498-502, 1999.
[26] M. Streun, G. Brandenburg, H. Larue, H. Saleh, E. Zimmermann, K. Ziemons, and H. Halling. "Pulse shape discrimination of LSO and LuYAP scintillators for depth of interaction detection in PET" *IEEE TNS*, vol. 50, pp. 344-347, 2003.
[27] A. Jeavons, R. Chandler, and C. Dettmar. "A 3-D HIDAC-PET camera with sub-millimetre resolution for imaging small animals" *IEEE TNS*, vol. 46, pp. 468-473, 1999.
[28] P. Bruyndonckx, X. Liu, S. Tavernier, and S. Zhang. "Performance study of a 3D small animal PET scanner based on BaF_2 crystals and a photo sensitive wire chamber" *Nucl. Instrum. Methods A*, vol. 392, pp. 407-413, 1997.
[29] D. McElroy, L. MacDonald, F. Beekman, Y. Wang, B. Patt, J. Iwanczyk, B. Tsui, and E. Hoffman. "Performance evaluation of A-SPECT: a high resolution desktop pinhole SPECT system for imaging small animals" *IEEE TNS*, vol. 49, pp. 2139-2147, 2002.
[30] G. Kastis, M. Wu, S. Balzer, D. Wilson, L. Furenlid, G. Stevenson, H. Barber, H. Barrett, J. Woolfenden, P. Kelly, and M. Appleby. "Tomographic small-animal imaging using a high-resolution semiconductor camera" *IEEE TNS*, vol. 49, pp. 172-175, 2002.
[31] L. Dobrucki and A. Sinusas. "Molecular imaging. A new approach to nuclear cardiology" *Q J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 49, pp. 106-115, 2005.
[32] S. Hume, R. Gunn, and T. Jones. "Pharmacological constraints associated with positron emission tomographic scanning of small laboratory animals" *Eur J Nucl Med*, vol. 25, pp. 173-176, 1998.
[33] C. S. Levin and E. J. Hoffman. "Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution" *Phys Med Biol*, vol. 44, pp. 781-799, 1999.
[34] A. Ochoa, L. Ploux, R. Mastrippolito, Y. Charon, P. Laniece, L. Pinot, and L. Valentin. "An original emission tomograph for in vivo brain imaging of small animals" *IEEE TNS*, vol. 44, pp. 1533-1537, 1997.
[35] D. e. a. Meier. "Silicon detector for a compton camera in nuclear medical imaging" *IEEE TNS*, vol. 49, pp. 812-816, 2002.
[36] S. Derenzo, "Precision Measurement of annihilation point spread distribution for medically important positron emitters," presented at 5th int Conf Positron Annihilation, Japan, 1979.
[37] C. Johnson, J. Seidel, R. Carson, W. Gandler, A. Sofer, M. Green, and M. Daube-Witherspoon. "Evaluation of 3D reconstruction algorithms for a small animal PET camera" *IEEE TNS*, vol. 44, pp. 1303-1308, 1997.
[38] P. Rigo, P. Paulus, B. Kaschten, R. Hustinx, T. Bury, G. Jerusalem, T. Benoit, and J. Foidart-Willems. "Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose" *Eur J Nucl Med*, vol. 23, pp. 1641-1674, 1996.
[39] H. Kornblum, D. Araujo, A. Annala, K. Tatsukawa, M. Phelps, and S. Cherry. "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET)" *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, pp. 655-660, 2000.
[40] D. Guilloteau, P. Emond, J. Baulieu, L. Garreau, Y. Frangin, L. Pourcelot, L. Mauclaire, J. Besnard, and S. Chalon. "Exploration of the dopamine transporter: in vitro and in vivo

characterization of a high-affinity and high-specificity iodinated tropane derivative (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-m ethylph enyl)nortropane (PE2I)" *Nucl Med Biol*, vol. 25, pp. 331-337, 1998.

[41] W. Frankle and M. Laruelle. "Neuroreceptor imaging in psychiatric disorders" *Ann. Nucl. Med.*, vol. 16, pp. 437-446, 2002.

[42] Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, DesRosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada D, and Shinohara M. "the [14C]Deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat" *J Neurochem*, vol. 28, pp. 897-916, 1977.

[43] A. Aliaga, J. Rousseau, R. Ouellette, J. Cadorette, J. van Lier, R. Lecomte, and F. Benard. "Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging" *Nucl Med Biol*, vol. 31, pp. 761-770, 2004.

[44] E. Croteau, F. Benard, J. Cadorette, M. Gauthier, A. Aliaga, M. Bentourkia, and R. Lecomte. "Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals" *J Nucl Med*, vol. 44, pp. 1655-1661, 2003.

[45] H. Iida, I. Law, B. Pakkenberg, A. Krarup-Hansen, S. Eberl, S. Holm, A. Hansen, H. Gundersen, C. Thomsen, C. Svarer, P. Ring, L. Friberg, and O. Paulson. "Quantitation of regional cerebral blood flow corrected for partial volume effect using O-15 water and PET: I. Theory, error analysis, and stereologic comparison" *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 20, pp. 1237-1251, 2000.

[46] J. Logan, A. Wolf, C. Shiue, and J. Fowler. "Kinetic modeling of receptor-ligand binding applied to positron emission tomographic studies with neuroleptic tracers" *J Neurochem*, vol. 48, pp. 73-83, 1987.

[47] S. Hume, A. Lammertsma, R. Myers, S. Rajeswaran, P. Bloomfield, S. Ashworth, R. Fricker, E. Torres, I. Watson, and T. Jones. "The potential of high-resolution positron emission tomography to monitor striatal dopaminergic function in rat models of disease" *J Neurosci Methods*, vol. 67, pp. 103-112, 1996.

[48] S. Gambhir, J. Barrio, M. Phelps, M. Iyer, M. Namavari, N. Satyamurthy, L. Wu, L. Green, E. Bauer, D. MacLaren, K. Nguyen, A. Berk, S. Cherry, and H. Herschman. "Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography" *Proc Natl Acad Sci*, vol. 96, pp. 2333-2338, 1999.

[49] V. Mittoux, S. Ouary, C. Monville, F. Lisovoski, T. Poyot, F. Conde, C. Escartin, R. Robichon, E. Brouillet, M. Peschanski, and P. Hantraye. "Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration" *J Neurosci.*, vol. 22, pp. 4478-4486, 2002.

[50] H. Benveniste and S. Blackband. "MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research" *Prog. Neurobiol.*, vol. 67, pp. 393-420, 2002.

[51] D. Yang, Q. Ye, D. Williams, T. Hitchens, and H. C. "Normal and transplanted rat kidneys: diffusion MR imaging at 7 T" *Radiology*, vol. 231, pp. 702-709, 2004.

[52] Q. Shen, H. Ren, H. Cheng, M. Fisher, and T. Duong. "Functional, perfusion and diffusion MRI of acute focal ischemic brain injury" *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. online, 2005.

[53] I. Pirko, S. Fricke, A. Johnson, M. Rodriguez, and S. Macura. "Magnetic Resonance Imaging, Microscopy, and Spectroscopy of the Central Nervous System in Experimental Animals" *Neurorx.*, vol. 2, pp. 250-264, 2005.

[54] R. Pautler. "In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI)" *NMR Biomed*, vol. 17, pp. 595-601, 2004.

[55] H. Moller, X. Chen, M. Chawla, G. Cofer, B. Driehuys, L. Hedlund, S. Suddarth, and G. Johnson. "Sensitivity and resolution in 3D NMR microscopy of the lung with hyperpolarized noble gazes" *Magn. Reson. Med.*, vol. 41, pp. 800-808, 1999.

[56] A. Louie, M. Huber, E. Ahrens, U. Rothbacher, R. Moats, R. Jacobs, S. Fraser, and T. Meade. "In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging" *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, pp. 321-325, 2000.

[57] J. Ackerman, T. Grove, G. Wong, D. Gadian, and R. GK. "Mapping of metabolites in whole animals by 31P NMR using surface coils" *Nature*, vol. 283, pp. 167-170, 1980.

[58] N. Sibson, A. Dhankhar, G. Mason, D. Rothman, K. Behar, and R. Shulman. "Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity" *Proc Natl Acad Sci*, vol. 95, pp. 316-321, 1998.
[59] P. Henry, V. Lebon, F. Vaufrey, E. Brouillet, P. Hantraye, and B. G. "Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo 1H-[13C] NMR spectroscopy" *J Neurochem.*, vol. 82, pp. 857-866, 2002.
[60] S. Srinivasan, H. Baldwin, O. Aristizabal, L. Kwee, M. Labow, M. Artman, and D. Turnbull. "Noninvasive, in utero imaging of mouse embryonic heart development with 40-MHz echocardiography" *Circulation*, vol. 98, pp. 912-918, 1998.
[61] F. Foster. "A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice" *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 28, pp. 1165-1172, 2002.
[62] D. Turnbull. "In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse embryos" *Comput Med Imaging Graph*, vol. 23, pp. 25-31, 1999.
[63] G. Lanza and S. Wickline. "Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy" *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 44, pp. 13-31, 2001.
[64] J. Lindner. "Assessment of inflammation with contrast ultrasound" *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 44, pp. 111-120, 2001.
[65] R. Shohet, S. Chen, Y. Zhou, Z. Wang, R. Meidell, R. Unger, and P. Grayburn. "Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium" *Circulation*, vol. 101, pp. 2554-2556, 2000.
[66] M. Yang, E. Baranov, A. Moossa, S. Penman, and R. Hoffman. "Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging" *Proc Natl Acad Sci*, vol. 97, pp. 12278-12282, 2000.
[67] C. Bremer, V. Ntziachristos, and R. Weissleder. "Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications" *Eur. Radiol.*, vol. 13, pp. 231-243, 2003.
[68] R. Weissleder, C. Tung, U. Mahmood, and A. Bogdanov. "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes" *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 375-378, 1999.
[69] B. Hasegawa, K. Iwata, K. Wong, M. Wu, A. Da Silva, H. Tang, W. Barber, A. Hwang, and A. Sakdinawat. "Dual-modality imaging of function and physiology" *Acad Radiol.*, vol. 9, pp. 1305-1321, 2002.
[70] I. Hildebrandt and S. Gambhir. "Molecular imaging applications for immunology" *Clin Immunol.*, vol. 111, pp. 210-224, 2004.
[71] M. Williams, V. Galbis-Reig, A. Goode, P. Simoni, S. Majewski, A. Weisenberger, R. Wojcik, W. Phillips, and M. Stanton. "Multimodality imaging of small animals" *El. J. RSNA*, vol. 3, 1999.
[72] K. Iwata, M. Wu, and B. Hasegawa. "Designed of a combined X-ray CT and SPECT systems for small animals" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, vol. 3, pp. 1608-1612, 1999.
[73] A. Goertzen, A. Meadors, R. Silverman, and S. Cherry. "Simultaneous molecular and anatomical imaging of the mouse in vivo" *Phys Med Biol*, vol. 47, pp. 4315-4328, 2002.
[74] R. Fontaine, J. Michaud, F. Belanger, J. Cadorette, J. Leroux, J.-F. Pratte, S. Robert, and R. Lecomte. "Design of a dual-modality, digital positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) scanner for small animal imaging" *Engineering in Medicine and Biology Society. Proceeding of the 25th Annual International Conference of the IEEE.*, vol. 1, pp. 998-1001, 2003.
[75] R. Fontaine, M. Tétrault, F. Bélanger, N. Viscogliosi, P. Bérard, J. Cadorette, J. Leroux, J. Michaud, J.-F. Pratte, C. Pepin, S. Robert, and R. Lecomte. "Preliminary results of a data acquisition sub-system for distributed, digital, computational, APD-based, dual-modality PET/CT architecture for small animal imaging" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2003.
[76] P. Delpierre. "PIXSCAN:micro-scanner-CT insérable dans un micro-TEP" *Présentation groupement de recherche 2917-Modélisation et Instrumentation pour l'Imagerie Biomédicale*, 2005.
[77] N. Cesca, G. Di Domenico, M. Gambaccini, E. Moretti, D. Moro, N. Sabba, and G. Zavattini. "A triple modality device for simultaneous small animal CT and PET-SPECT imaging" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2004.

[78] R. Blasberg. "In vivo molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations" *Nucl Med Biol*, vol. 30, pp. 879-888, 2003.
[79] G. Alexandrakis, F. Rannou, R. Leahy, and A. Chatziioannou. "Feasibility of achieving quantitative 3-D bioluminescence images by use of a combined optical-positron emission tomography tomographic system" *Scientific abstracts of the 2005 annual conference of the academy of molecular imaging*, vol. 151, pp. 120, 2005.
[80] A. Douraghy, D. Prout, R. Silverman, and A. Chatziioannou. "Investigation of scintillator materials for use in optical and positron emission tomography" *Scientific abstracts of the 2005 annual conference of the academy of molecular imaging*, vol. 187, pp. 129, 2005.
[81] E. Tsyganov, P. Antich, P. Kulkarni, R. Mason, R. Parkey, S. Seliuonine, J. Shay, T. Soesbe, and A. Zinchenko. "Micro-SPECT combined with 3-D optical imaging" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2004.
[82] H. Iida, I. Kanno, S. Miura, M. Murakami, K. Takahashi, and K. Uemura. "A simulation study of a method to reduce positron annihilation spread distribution using a strong magnetic field in Positron Emission Tomography" *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 33, pp. 597-600, 1986.
[83] B. Hammer. "NMR-PET scanner apparatus" *U.S. Patent Number*, vol. 4, 939, pp. 464, 1990.
[84] B. Hammer, N. Christensen, and B. Heil. "Use of a magnetic field to increase the spatial resolution of Positron Emission Tomography" *Medical Physics*, vol. 21, pp. 1917-1920, 1994.
[85] B. E. Hammer and N. L. Christensen. "Measurement of positron range in matter in strong magnetic fields" *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 42, pp. 1371-1376, 1995.
[86] R. R. Raylman, A. C. Clavo, S. C. Crawford, B. Recker, and R. L. Wahl. "Magnetically-enhanced radionuclide therapy (MERiT):in vitro evaluation" *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, vol. 37, pp. 1201-1206, 1997.
[87] J. Mackewn, D. Strul, W. Hallett, P. Halsted, R. Page, S. Keevil, S. Williams, S. Cherry, and P. Marsden. "Design and development of an MR-compatible PET scanner for imaging small animals" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2004.
[88] S. Takamatsu, S. Yamamoto, H. Murayama, and K. Minato. "Design and construction of a multi-slice, depth-of-interaction MR-compatible PET" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2004.
[89] D. Schlyer, W. Rooney, C. Woody, P. Vaska, A. Kriplani, and S. Stoll. "Development of a simultaneous PET/MRI scanner" *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record*, 2004.
[90] Y. Shao, S. R. Cherry, K. Farahani, R. Slates, R. W. Silverman, K. Meadors, A. Bowery, S. Siegel, P. K. Marsden, and P. B. Garlick. "Development of a PET detector system compatible with MRI/NMR systems" *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 44, pp. 1167-1171, 1997.
[91] P. K. Marsden, D. Strul, S. F. Keevil, S. C. William, and D. Cash. "Simultaneous PET and NMR" *The British Journal of Radiology*, vol. 75, pp. S53-S59, 2002.
[92] P. Garlick. "Simultaneous PET and NMR - initial results from isolated, perfused rat hearts" *The British Journal of Radiology*, vol. 75, pp. S60-S66, 2002.

Chapitre II

Une technique complémentaire à la Tomographie par Emission de Positons chez le petit animal : la β-MicroProbe

Les diverses modalités d'exploration des phénomènes physiologiques et biochimiques ont été présentées dans le chapitre précédent, dévoilant leurs cibles d'intérêt, leurs avantages mais également leurs limites intrinsèques. Parmi ces détecteurs, les radioimageurs (l'imagerie TEP et TEMP) ont une place de choix puisqu'ils permettent d'étudier avec une haute sensibilité la biodistribution et les chemins métaboliques empruntés par les molécules marquées radioactivement. Ils bénéficient de plus d'un large nombre de radiotraceurs déjà développés pour étudier fonctions et cibles biologiques spécifiques (neurotransmetteurs, enzymes, expression génique, …). Néanmoins, les radiotomographes actuels souffrent de plusieurs inconvénients : un coût élevé, une résolution temporelle encore limitée (le plus souvent entre la seconde et plusieurs minutes), la difficulté de leurs couplages avec d'autres techniques et l'impossibilité de réaliser des études chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements.

Dans ce contexte et pour répondre à ces limitations, l'équipe "Imagerie et radioquantification *in vivo* en neurosciences" du groupe IPB a développé et validé dans un contexte biologique à partir de la fin 1996 la sonde radiosensible SIC (Sonde IntraCérébrale), permettant la mesure quantitative de molécules marquées à l'aide d'isotopes β^+. Son implantation *in situ* permet d'obtenir les cinétiques locales de fixation des radiotraceurs sur leur cible d'intérêt avec une haute résolution temporelle. De plus, le dispositif est simple et peu onéreux, relativement facile à coupler avec d'autres techniques *in vivo*. Depuis 2001, la sonde est développée et commercialisée par la société Biospace sous le nom de β-MicroProbe. Après avoir présenté le principe de détection de la sonde ainsi que les choix technologiques adoptés, les différents champs d'investigation biologique explorés depuis l'élaboration de la β-MicroProbe seront exposés.

I Caractéristiques de la β-MicroProbe

Tout comme les tomographes TEP, la β-MicroProbe détecte la radioactivité issue des molécules radiomarquées avec des isotopes β^+ afin de suivre l'évolution de ce traceur dans l'organisme au cours du temps. Néanmoins, contrairement à ce type de techniques, la sonde ne détecte pas les γ d'annihilation de 511keV mais directement les positons. Avant de détailler l'architecture même du détecteur, nous nous intéresserons dans un premier temps au principe physique relatif à la détection des β et définirons les principaux paramètres caractérisant la sonde à savoir la sensibilité et le Volume de Détection (VD) de la sonde. Enfin, nous présenterons l'exemple d'un protocole biologique type, ceci nous permettra de mieux appréhender l'utilisation de la β-MicroProbe dans le cadre d'études biologiques chez le petit animal.

I. 1 Principe de détection de la β-MicroProbe

La β-MicroProbe permet une mesure locale quantitative de la concentration en radiotraceurs marqués à l'aide d'isotopes β^+. Le principe de détection de la sonde repose sur le parcours limité des particules β dans les tissus. Ainsi, la radioactivité détectée par la sonde décrit un volume de détection centré sur la partie sensible de la sonde, propre à chaque isotope. Plus l'énergie de l'isotope sera importante, plus le VD sera grand (Fig. II.1). Le tableau II.1 répertorie les caractéristiques des trois principaux isotopes β^+ utilisés en imagerie TEP et pour chacun, le rayon de détection moyen pour que 90% des positons soient détectées par la sonde.

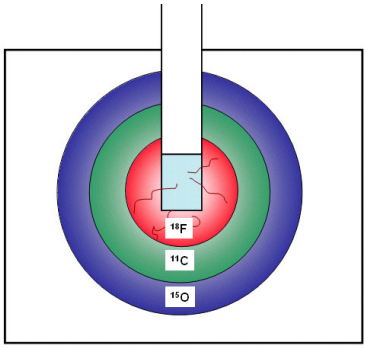


Figure II.1 : *Schéma du volume de détection défini par le parcours de positons.*

Isotope	Type	Période (min) *	Energie maximum (keV) *	Parcours développé (mm) [1]	Rayon de détection correspondant à 90% du signal détecté (mm) ξ
^{18}F	β^+	109.74	633.5	2.30	0.8
^{11}C	β^+	20.38	960.1	3.95	1.4
^{15}O	β^+	2.04	1738.5	8.20	2.7

Tableau II.1 : *Caractéristiques des principaux isotopes utilisés en TEP et rayons de détection associés dans les tissus cérébraux*

* Tiré du "Radionucléides", DAMRI, CEA.
[1] Tiré du National Institute of Standards and Technology.
ξ Simulation Geant4 dans les tissus cérébraux pour une sonde de 500 µm.

A présent, nous allons nous attacher plus précisément à l'implication du parcours des positons dans un contexte biologique. Ainsi, pour le ^{18}F, très largement utilisé en médecine nucléaire, 90% des évènements vus par une sonde de 500 µm sont compris dans une boule équivalente de 0,8 mm de rayon tandis que le ^{11}C a un VD de 1,4 mm de rayon. Pour appréhender visuellement le rapport entre le VD et les structures cérébrales d'intérêt, le résultat de précédentes simulations pour la détection de molécules marquées au ^{18}F chez le rat est présenté figure II.2 [1]. Dans ce cas précis, le champ de vue pour cet isotope est superposé à une coupe latérale de cerveau de rat obtenue à partir d'un atlas [2]. Cet exemple montre l'adéquation entre le champ de vue de la sonde et les aires du cerveau étudiées, ici le striatum et le cervelet.

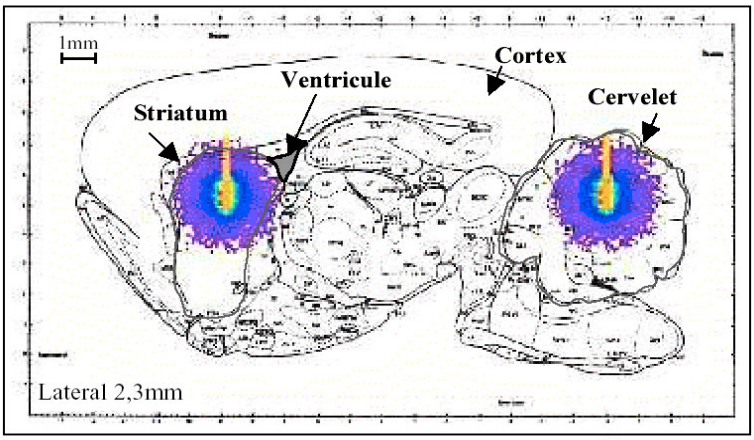


Figure *II.2 :* *Superposition du volume de détection simulé pour le ^{18}F sur une coupe latérale de cerveau de rat pour deux sondes de 500µm implantées dans le striatum et le cervelet.*

I. 2 Sensibilité de détection de la β-MicroProbe

Le signal M mesuré par la sonde est définie comme l'intégrale de la concentration locale $C(\vec{r})$ multipliée par l'efficacité locale $\varepsilon(\vec{r})$ sur le volume $d\vec{r}$ dans lequel la sonde est placée (éq. II.1), l'efficacité locale $\varepsilon(\vec{r})$ étant le rapport entre le nombre de coups par seconde, qui est localement détectée par la sonde, et l'activité de la source radioactive. Si la concentration est uniforme, l'équation II.1 peut être réécrite selon l'équation II.2 avec C_0 défini comme la concentration uniforme.

Par suite, la sensibilité (S) est définie comme l'intégrale de l'efficacité sur le volume (éq. II.3). En pratique, la sensibilité est obtenue en divisant le nombre de coups (cps) mesuré par la concentration en radioactivité et est exprimée en cps/kBq/mL (on peut noter que cela correspond à un volume) [3].

$$M = \int C(\vec{r})\, \varepsilon(\vec{r})\, d\vec{r} \qquad \text{(II. 1)}$$

$$M_0 = C_0 \int \varepsilon(\vec{r})\, d\vec{r} \qquad \text{(II. 2)}$$

$$S = \int \varepsilon(\vec{r})\, d\vec{r} = \frac{M_0}{C_0} \qquad \text{(II. 3)}$$

Les sensibilités de détection évaluées pour une source de ^{18}F et de ^{11}C par exemple sont de l'ordre de 0.20 cps/kBq/mL et 0.44 cps/kBq/mL respectivement, pour une sonde de 500 µm de diamètre et 1 mm de scintillateur (cf. chap. III §III). Cette sensibilité, qui dépend de l'isotope utilisé et de la géométrie de la sonde, notamment la longueur de la zone radiosensible conduit, pour les doses injectées typiques (de l'ordre de quelques dizaines de MBq), à des niveaux de signal mesuré de quelques dizaines à quelques centaines de coups/s. Ceci permet la mesure de cinétique de fixation des radiotraceurs avec une fréquence d'échantillonnage de l'ordre de la seconde durant l'ensemble de l'expérience.

I. 3 Volume de Détection de la sonde

Le VD de la sonde est le volume dans lequel les positons sont détectables. Ainsi, si l'on découpe le volume Ω dans lequel la sonde est plongée en volumes élémentaires, le VD peut être défini comme l'intégrale des volumes élémentaires pour lesquels l'efficacité locale n'est pas nulle (éq. II.4).

$$VD = \int_{\Omega / (\varepsilon(\mathbf{r})\neq 0)} d\vec{r} \qquad \text{(II. 4)}$$

De manière similaire au FWTM (Full Width at Tenth Maximum) qui caractérise la précision de localisation du TEP,[Derenzo] nous avons défini le VD_{90} correspondant au volume d'où provient 90% du signal mesuré. En effet, au-delà de ce volume, la contribution du signal est très faible en raison de la très faible efficacité de détection $\varepsilon(\vec{r})$. Nous verrons plus en détail les résultats obtenus pour le VD au chapitre III.

I. 4 Protocole type d'utilisation de la β-MicroProbe dans le cas des études cérébrales pratiquées en aigue

Le protocole d'utilisation de la β-MicroProbe compte trois étapes principales, (i) la calibration, (ii) la mise en place stéréotaxique des sondes et (iii) l'acquisition, étapes que nous allons à présent détailler.

(i) La calibration va nous permettre de déterminer la sensibilité des sondes utilisées. Pour cela, les sondes sont immergées dans une source d'activité homogène connue. Le nombre de coups détecté par la sonde divisé par la concentration en radioactivité nous donne la sensibilité, permettant de retrouver la concentration d'activité dans la structure cérébrale étudiée (éq. II. 3).

(ii) Pour placer précisément les sondes dans les structures que l'on souhaite étudier, l'animal est placé dans un appareil stéréotaxique. Les structures du cerveau sont repérées à l'aide d'un atlas de cerveau de rat [2], par des coordonnées dont l'origine est le bregma, point de jonction entre deux fissures du crâne facilement repérable visuellement. Ainsi, cette étape comprend :
¤ l'anesthésie de l'animal (uréthane, isofluorane ou kétamine/xylazine, …).
¤ l'implantation d'un cathéter (cathétérisation) dans une veine (caudale ou fémorale) pour l'injection ultérieure du traceur.
¤ le placement de l'animal sur le cadre stéréotaxique.
¤ le repérage du bregma et des coordonnées des structures d'intérêt.

¤ la chirurgie crânienne.
¤ l'implantation des sondes.

(iii) Une fois l'acquisition lancée, une vingtaine de minutes après stabilisation du système, on effectue une mesure du bruit de fond puis on injecte le traceur. L'acquisition dure typiquement entre 1 et 2 heures. Enfin, les données sont corrigées du bruit et de la décroissance radioactive.

Il est à noter que selon la structure cérébrale que l'on souhaite étudier et l'isotope que l'on va employer, la quantification de la cinétique du traceur devra être considérée selon deux configurations possibles :
-- Le cas le plus favorable correspond au cas où le volume de détection est entièrement compris dans la zone d'intérêt. Dans cette configuration, le signal détecté coïncide avec le signal spécifique, c'est-à-dire issu des molécules radiomarquées présentes dans le milieu étudié. La concentration du traceur dans les tissus au cours du temps est alors obtenue en divisant l'activité enregistrée par la sensibilité de détection de la sonde.
-- Dans le second cas, la région cérébrale étudiée est plus petite que le volume de détection ou non entièrement comprise dans ce dernier. De ce fait, seule une partie du signal enregistré répondra au signal spécifique, l'autre partie correspondant au signal non spécifique issu des zones périphériques mais également compris dans le champ de vue de la sonde. Dans cette seconde situation, la quantification absolue de la concentration en traceur dans la zone cérébrale d'intérêt pourra être déterminée par simulation Monte Carlo (cf. chap. IV §III-IV) associée à la connaissance préalable de la distribution autoradiographique du traceur.

II Description de la β-MicroProbe

Les choix technologiques et le développement de la sonde radiosensible β ont fait l'objet de la thèse de Frédéric Pain [4] débutée courant 1998. La sonde devait répondre à 5 exigences :

1/ Un diamètre de sonde n'excédant pas 1 mm, dimension limite compatible avec les dimensions réduites des structures cérébrales chez le rat (comparable aux sondes de microdialyse qui sont de l'ordre de 500 µm de diamètre).
2/ La biocompatibilité des matériaux employés.
3/ Un détecteur sensible aux β associé à une faible détection des γ d'annihilation de 511 keV.
4/ Un photomultiplicateur adapté à la mesure de faibles niveaux lumineux.
5/ Un système souple et de faible poids pour ne pas perturber les études *in vivo* chez l'animal vigile et libre de ses mouvements.

Le choix du détecteur répondant à ces exigences s'est arrêté sur une fibre optique scintillante sensible aux β fusionnée à une fibre claire. Cette partie implantée stéréotaxiquement dans le cerveau de l'animal est reliée via un guide optique à un module de photodétection constitué d'un photomultiplicateur bas bruit et d'une électronique de comptage. La figure II.3 présente le premier prototype de la sonde, baptisée SIC pour Sonde IntraCérébrale, réalisé début 2000. Les principales caractéristiques des différents modules composant ce détecteur vont à présent être détaillées.

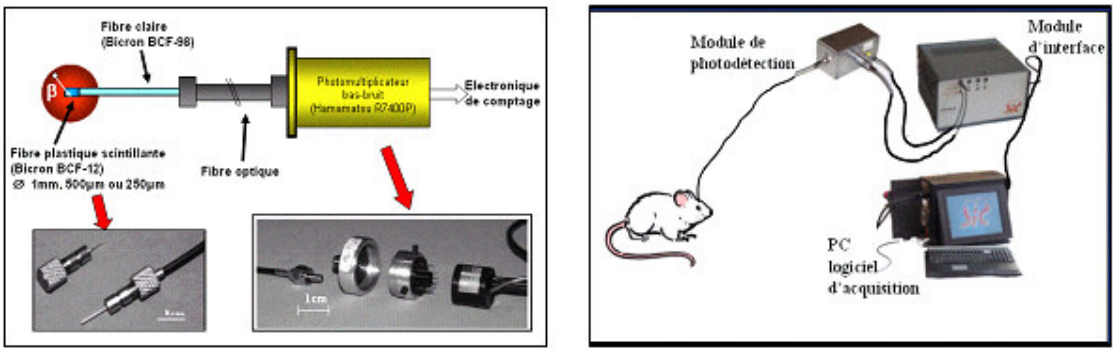


Figure *II.3 :* *Gauche (a) : architecture du détecteur SIC – Droite (b) : ensemble des modules du premier prototype (2000).*

I. 2. 1 Partie implantée : le scintillateur et la fibre claire

Le choix du scintillateur a été principalement basé sur une minimisation de la détection des γ d'annihilation. En effet, l'objectif étant la détection des émissions β, les gammas de 511 keV constitue alors un bruit de fond. Dans cette perspective, de précédents travaux [5] ont montré que le rapport signal (dû aux particules β interagissant dans la fibre) sur bruit (généré par les γ d'annihilation) dépendait de l'inverse du coefficient d'atténuation pour les γ de 511 keV pour un scintillateur donné. Ce rapport a été évalué pour le scintillateur inorganique LSO et pour un scintillateur plastique. Un facteur 10 a été déterminé entre les deux rapports en faveur du scintillateur plastique. Par conséquent, bien que les scintillateurs inorganiques présentent un meilleur rendement lumineux dans le cas des β que les scintillateurs organiques, une sonde scintillante plastique a été préférée pour pallier au bruit de fond γ. Des recherches effectuées dans le but d'obtenir une sonde répondant aux mêmes exigences ont été réalisées par d'autres groupes notamment basée sur l'utilisation de scintillateur LSO [6] et sur un seuillage en énergie des gammas d'annihilation. Cependant, les spectres en énergie β^+, notamment pour le ^{18}F, étant relativement supérieurs à 511 keV, le seuillage des gammas a entraîné inévitablement une sensibilité de détection trop faible pour une utilisation pertinente en biologie.

Dans notre cas, les fibres scintillantes constituant actuellement la sonde sont des fibres rondes Bicron BCF-12 d'un diamètre de 0.25, 0.5 ou 1.0 mm composée d'un cœur scintillant entouré d'un double cladding[2]. Les caractéristiques de ces fibres sont détaillées dans le Tableau II.2. Les positons interagissant avec la partie scintillante vont déposer une partie de leur énergie créant un signal lumineux d'intensité proportionnelle à l'énergie déposée et principalement émis dans le bleu. La différence d'indice entre les trois matériaux assure une plus grande efficacité de collection de la lumière.

Les fibres non scintillantes de type BCF-98 possèdent les mêmes indices de cœur et de cladding que la fibre scintillante afin de minimiser les phénomènes de réfraction à l'interface. Pour limiter les pertes et assurer une bonne reproductibilité dans la qualité de l'interface, la fibre scintillante est fusionnée à une fibre claire grâce à une technique développée par le service SED-DAPNIA du CEA-Saclay pour la physique des particules [7]. Ce procédé s'est révélé particulièrement efficace (de 5 à 50% d'efficacité de collection en

[2] Gaine entourant le cœur scintillant de la fibre et permettant une meilleure collection de la lumière.

plus) par rapport à une technique de collage plus classique [4]. La sonde ainsi fusionnée est alors collée dans une férule métallique.

	Coeur	Premier Cladding	Second Cladding
Matériau	Polystyrène	Acrylique	Fluor-Acrylique
Indice de réfraction	1.60	1.49	1.42
Pic d'émission	435 nm	-	-
Temps de scintillation	3.2 ns	-	-
Densité (g/cm^3)	1.05	-	-
Epaisseur	-	3% du diamètre de la fibre	1% du diamètre de la fibre
Rendement lumineux	8000 photons/MeV	-	-
Efficacité de collection de la lumière	5.6% au minimum		

Tableau II.2 : *Caractéristiques de la fibre plastique scintillante Bicron BCF-12.*

I. 2. 2 Interface sonde/module de photodétection

A l'aide d'une connectique spécifique sur la base du standard SMA, la sonde est reliée à un guide optique en polymère plastique (PMMA) d'un millimètre de diamètre pour assurer une transmission optique optimale (Fig. II.3). Ce conditionnement est assuré par la société LUXERI (Gometz le Chatel, France).

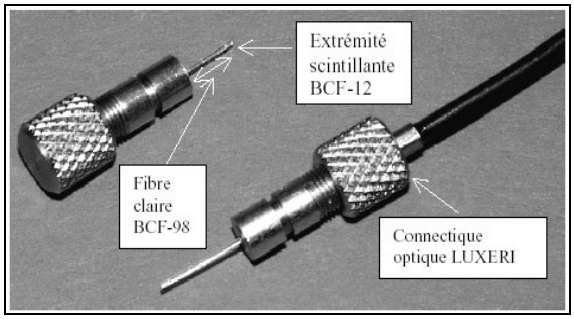


Figure II.3 : *Connecteurs optiques du détecteur.*

I. 2. 3 Système de photodétection

Le choix du photodétecteur a été basé sur deux contraintes majeures [8]. D'un côté, le photodétecteur devait être adapté aux mesures de faibles taux de lumière. De plus, il devait être compact et léger pour être compatible avec les études sur l'animal éveillé et libre de ses mouvements. Le photomultiplicateur sélectionné est un tube Hamamatsu R7400P possédant un bruit intrinsèque faible permettant un seuillage très bas en énergie et une sensibilité spectrale adaptée à la longueur d'onde de la lumière de scintillation. Il dispose également d'une haute stabilité en terme de gain et de bruit, essentielle pour les expériences biologiques qui durent très souvent plus d'une heure. Ses principales caractéristiques sont résumées dans le tableau II.3.

Tension nominale	Gain à 800V	Bruit d'obscurité	Photocathode	Diamètre Photo-cathode	Efficacité quantique à 435nm	Poids	Nombre de dynodes
800V	7.10^5	5 cps à 25°C	Bialkaline	8 mm	25%	5 g	8

Tableau II.3 : *Caractéristiques du tube photomultiplicateur R7400P Hamamatsu*

La chaîne d'acquisition réalisée par L. Pinot (Ingénieur de Recherche du groupe IPB) en collaboration avec le Service d'électronique Physique de l'IPNO comporte 3 parties distinctes (Fig. II.3 (b)) et peut gérer jusqu'à 4 sondes simultanément. Un module de photodétection contient un photomultiplicateur et son convertisseur haute tension associé. Ce module est relié à une carte du traitement du signal permettant l'intégration des impulsions électriques issues des photodétecteurs, au-delà d'un seuil analogique réglable permettant de s'affranchir du bruit électronique. Puis les signaux intégrés analogiques sont transmis par un bus vers un PC où une carte de format PCI réalise leur codage numérique. Enfin, une interface graphique codée en Labview permet la visualisation en temps réel de la cinétique du traceur mesurée par chacune des sondes qui est directement proportionnelle à la concentration en molécules radiomarquées dans le volume de détection.

Les performances du système de détection évaluées après immersion des sondes dans une source aqueuse de ^{18}F ont permis de vérifier la bonne linéarité du système en fonction du temps, de la concentration en radioactivité et de la longueur du scintillateur. Sur la base de ces résultats, la validation du détecteur a été entreprise pour différentes études biologiques, qui vont à présent être exposées.

III Champs d'investigation biologique

La validation biologique de la sonde SIC a été réalisée à la fois dans le cadre d'études neuropharmacologiques du système dopaminergique et sérotoninergique en collaboration avec le Centre d'Etude et de Recherche Médicale par Emission de Positons (CERMEP, Lyon) ainsi que pour l'étude du métabolisme cérébrale sous activation chez le rongeur. Cette dernière approche a été mise en œuvre au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ, Orsay). Actuellement, une quinzaine de β-MicroProbe sont exploitées dans différents laboratoires de recherche à travers le monde. Ainsi, les applications biologiques réalisées avec la sonde se sont intensifiées et diversifiées tant en neuropharmacologie qu'en neurophysiologie mais également à des fins méthodologiques chez le rat avec la mesure de la fonction d'entrée. Les études accomplies dans ces trois différents domaines seront résumées dans cette seconde partie. L'exposé des divers champs d'investigation possibles de la sonde permettra de mettre en lumière les atouts de la β-MicroProbe et son rôle complémentaire par rapport aux microtomographes.

II. 1 Etudes pharmacocinétiques

La β-MicroProbe est particulièrement bien adaptée aux études pharmacocinétiques. En effet, cette discipline s'attache à décrire le devenir des médicaments[3] dans l'organisme et précise de manière qualitative et quantitative les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination de celui-ci. Lié à un isotope radioactif, le produit radiopharmaceutique va ainsi pouvoir être détecté par la sonde à l'endroit cible de l'organisme où il s'accumule et sa cinétique pourra être déterminée. Dans ce contexte, les mesures possibles avec la β-MicroProbe sont particulièrement bien adaptées aux cinétiques *in vivo* des systèmes de neurotransmission de par la taille des régions cérébrales d'intérêt ainsi que par le développement de nouveaux radiotraceurs spécifiques. L'objectif poursuivi est de pouvoir tester des traceurs potentiels [9] et principalement de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénomènes de neurotransmission, dont deux exemples vont être à présent exposés.

II. 1. 1 Etudes pharmacocinétiques du système de neurotransmission dopaminergique

L'une des premières validations biologiques de la sonde s'est portée sur l'étude du système dopaminergique (plus particulièrement sur la voie nigro-striée) chez le rat. En effet, la compréhension des mécanismes sous-jacents à ce système est d'autant plus cruciale que les troubles l'affectant ont été observés chez les personnes souffrant de pathologies neurologiques comme la maladie de Parkinson ainsi que chez les toxicomanes. Montrer la faisabilité de mesurer *in vivo* à l'aide de la sonde la fixation spécifique d'un ligand des récepteurs dopaminergiques D2, le [^{11}C]-Raclopride, a donc été entreprise dès 2001 [10].

Dans ce contexte, les expériences ont été effectuées sur des rats anesthésiés en mesure aigue [10, 11]. Le protocole a consisté à implanter stéréotaxiquement deux sondes : l'une dans le striatum, zone de marquage spécifique des récepteurs D2 (Fig. II.4), l'autre dans le cervelet, zone de marquage non spécifique puisque dépourvue en récepteurs dopaminergiques D2. La soustraction du signal non spécifique, obtenu par la sonde implantée dans le cervelet, au signal issu de la sonde implantée dans le striatum permet d'acquérir de manière reproductible la cinétique de fixation du [^{11}C]-Raclopride. Les résultats de ces expériences ont montré un accord entre les données de la sonde et les données pharmacocinétiques publiées en imagerie TEP. On peut en particulier noter une cohérence entre les deux techniques en ce qui concerne l'allure des cinétiques de marquage spécifique atteignant un plateau autour de 25 min après injection du traceur (Fig. II.5).

Des études similaires ont d'ailleurs été menées dans ce sens chez le rat couplant simultanément les techniques TEP et β-MicroProbe [4]. Les courbes cinétiques obtenues avec la β-MicroProbe ont également présenté une bonne adéquation avec les cinétiques acquises avec le radiotomographe (ECAT HR+).

[3] "On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques." (article L.511 du Code de la Santé Publique).

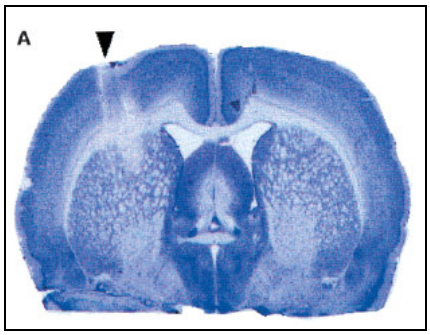


Figure *II.4 :* *Localisation de la β-MicroProbe dans le striatum de rat sur une section de 20 μm de cerveau de rat colorée au crésyl bleue.*

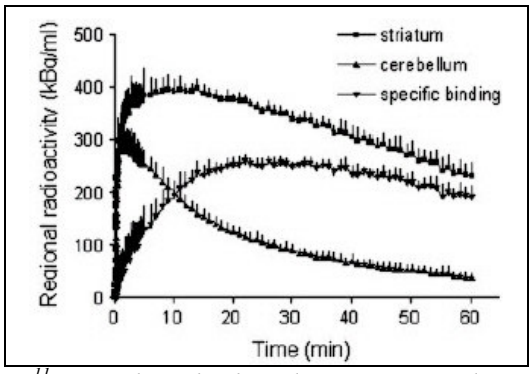


Figure *II.5 :* *Fixation du [^{11}C]-Raclopride dans le striatum, et le cervelet ainsi que la fixation spécifique correspondante.*

Des expériences de compétition ont également indiqué la faisabilité de mesurer, à l'aide de la sonde, le déplacement du traceur de son site d'occupation (récepteurs D2) par la molécule endogène [11]. En effet, une diminution significative de la fixation du [^{11}C]-Raclopride a été enregistrée après une injection d'amphétamine (ou d'halopéridol), substances connues pour augmenter le taux de dopamine endogène (Figure II.6). A l'inverse, une diminution de dopamine endogène, conséquente à une injection de réserpine, entraîne une augmentation du signal spécifique.

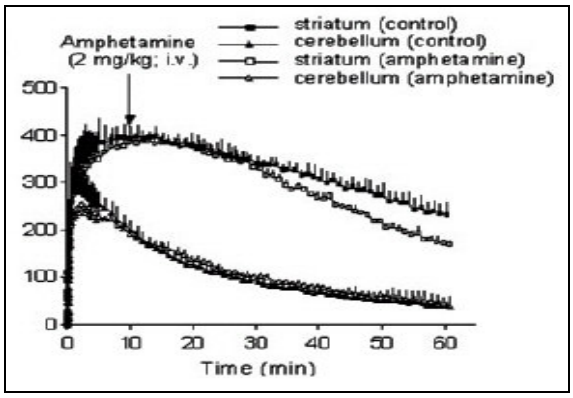


Figure *II.6 :* *Déplacement du [^{11}C]-Raclopride après augmentation du taux de dopamine extracellulaire induit par injection d'amphétamine.*

II. 1. 2 Etudes pharmacocinétiques du système de neurotransmission sérotoninergique

La validation biologique de la β-MicroProbe a également été accomplie sur le système sérotoninergique à l'aide du [^{18}F]-MPPF, un antagoniste[4] spécifique des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}. L'effet d'une augmentation extracellulaire de sérotonine sur le marquage spécifique du [^{18}F]-MPPF a été investigué au niveau du noyau du raphé dorsal [12] et de l'hippocampe (Fig. II.7) [13], régions riches en récepteurs 5-HT_{1A}.

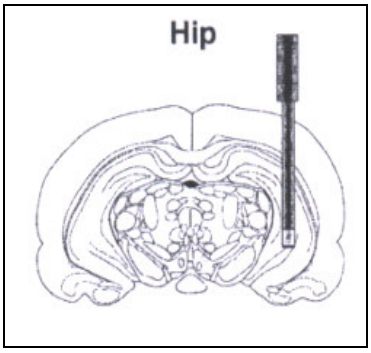


Figure *II.7 :* *Localisation de la β-MicroProbe dans l'hippocampe de rat.*

Ces deux études sont particulièrement intéressantes puisqu'elles mettent en jeu un couplage simultané avec la microdialyse (Fig. II.8). La microdialyse est une technique de mesure *in vivo* chez le petit animal impliquant l'implantation d'une sonde de dialyse permettant d'identifier et de quantifier chimiquement les molécules présentes dans le milieu extracellulaire.

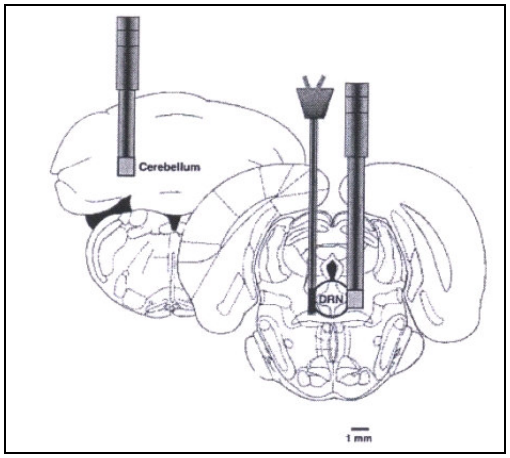


Figure *II.8 :* *Localisation de deux β-MicroProbe, l'une dans le cervelet et l'autre proche du raphé dorsal (DRN) et localisation d'une sonde de microdialyse proche du côté contralatéral du DRN chez le rat anesthésié.*

[4] Antagoniste : molécule synthétique dont l'action s'oppose à celle du neuromédiateur – et du (ou des) agoniste(s) correspondant(s) – au niveau de son site récepteur. Un antagoniste peut éventuellement avoir une structure chimique proche de celle de l'agoniste, mais il n'induit pas pour autant les mêmes effets physiologiques ; il bloque, au contraire, de manière plus ou moins sélective et plus ou moins durable toute action ultérieure de l'agoniste ; Agoniste : molécule qui mime l'action du neurotransmetteur sur son site récepteur et entraîne par conséquent des effets identiques. Cette propriété découle d'analogies structurales existant entre l'agoniste et le neurotransmetteur.

Le protocole expérimental consiste à implanter stéréotaxiquement deux sondes, l'une dans le cervelet (Fig. II.8), l'autre soit dans l'hippocampe, soit au plus proche du raphé selon l'étude. Les données obtenues simultanément par microdialyse ont permis de confirmer une augmentation de sérotonine dans le milieu extracellulaire après injection de fenfluramine simultanément à une baisse de fixation spécifique du [^{18}F]-MPPF enregistrée par la β-MicroProbe.

L'importance du rôle du système sérotoninergique dans de nombreux processus physiologiques (sommeil, apprentissage, comportement sexuel) et désordres psychiatriques (anxiété, dépression, schizophrénie) ainsi que les résultats démontrant la sensibilité de la sonde au déplacement du [^{18}F]-MPPF selon la variation du taux de sérotonine extracellulaire ont stimulé des études plus poussées de ce système, qui ont été réalisées depuis et seront détaillées dans le chapitre IV (§ I.4-5).

II. 2 Etudes fonctionnelles : quantification du Métabolisme Energétique Cérébrale chez le rat

Le cerveau consomme 20% de l'énergie totale disponible dans l'organisme bien qu'il ne représente qu'environ 2% de la masse corporelle. Son fonctionnement est caractérisé par une relation étroite entre activité neuronale, métabolisme énergétique (glucose et oxygène) et débit sanguin cérébral. Ainsi, toutes les techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale sont fondées sur les variations de consommation oxygène ou en glucose (cf. chap.I). La TEP peut notamment détecter les augmentations localisées : du débit sanguin et d'utilisation de glucose (cf. chap.I §I.2.3B). De nombreuses cartographies reflétant l'état d'activation neuronale ont pu être réalisées à partir de ce principe, permettant d'acquérir toujours plus d'informations sur les états fonctionnels du cerveau. De plus, une variation trop importante du métabolisme énergétique est très souvent synonyme de comportement pathologique [14, 15], comme pour le cancer (augmentation de la consommation) ou les maladies neurodégénératives (diminution dans le cas d'Alzheimer). Les apports de l'utilisation de la β-MicroProbe dans ce domaine seront illustrés dans le paragraphe suivant.

II. 2. 1 Mesures du Métabolisme Energétique Cérébrale du glucose chez le rat

La première approche concerne l'étude locale du métabolisme du glucose chez le rat anesthésié en condition repos et sous activation neuronale induite par une stimulation des vibrisses à l'aide d'un analogue du glucose, le [^{18}F]-FDG [16]. Il est bien établi qu'une stimulation unilatérale des vibrisses active le cortex somatosensoriel contralatéral [17, 18]. Afin de tester la faisabilité de la sonde à détecter de faibles variations métaboliques, deux sondes ont été implantées dans le cortex somatosensoriel bilatéralement. Le paradigme expérimental débute par une première injection de [^{18}F]-FDG. Puis, après une heure de condition au repos, une stimulation unilatérale et continue est effectuée suivie d'une seconde injection de [^{18}F]-FDG. Tout au long de l'expérience, des échantillons sanguins sont prélevés avec un rythme accru au moment des injections de radioactivité, permettant la modélisation des données cinétiques obtenues sur la base du modèle compartimental du glucose [19, 20] présenté par la suite.

La figure II.9 représente les signaux détectés par les deux sondes en fonction du temps rapportés à la dose injectée. En condition repos, les courbes acquises sont similaires

tandis que sous stimulation, une augmentation de l'accumulation de [^{18}F]-FDG de 10% en moyenne est observée par la sonde située dans le cortex contralatéral. Ces mesures sont en accord avec celles obtenues par d'autres techniques (autoradiographie [21] et microTEP [22]).

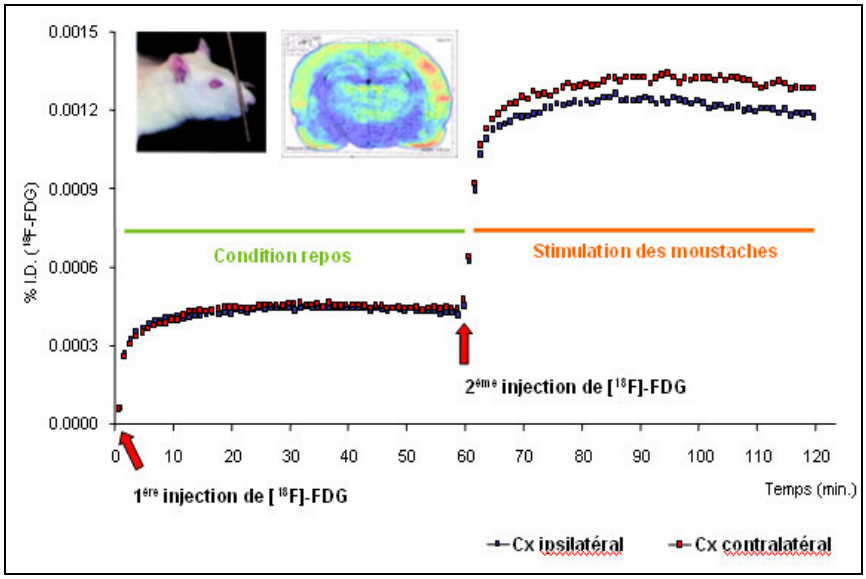


Figure II.9 : *Activité (en % de la dose injectée) détectées par les sondes en fonction du temps en fonction du temps en condition repos et sous activation -- En haut à gauche : Stimulation unilatérale des vibrisses du rat entraînant une augmentation de l'accumulation de [^{18}F]-FDG au niveau du cortex somatosensoriel contralatéral remarquable par autoradiographie.*

Cependant, la haute résolution temporelle du détecteur permet d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la concentration en [^{18}F]-FDG observée. En effet, il est possible à partir des données expérimentales d'extraire les constantes biochimiques sous-jacentes en effectuant une modélisation compartimentale. Le modèle utilisé dans ce cas est le modèle de Sokoloff [19] qui comprend trois compartiments reliés par 4 constantes cinétiques (Fig. II.10). Ces trois compartiments correspondent respectivement au [^{18}F]-FDG circulant dans le sang (fonction d'entrée), puis au [^{18}F]-FDG dans les tissus et enfin à la première étape de métabolisation du [^{18}F]-FDG réalisée par l'enzyme hexokinase. Contrairement au glucose, la métabolisation du [^{18}F]-FDG est bloquée à ce stade et le traceur s'accumule dans l'espace intra-cellulaire. Par conséquent, l'accumulation du traceur reflète directement l'activité de l'hexokinase. A partir de la mesure de la fonction d'entrée et des mesures β-MicroProbe, on peut résoudre le système d'équations du premier ordre décrivant les variations de la concentration au cours du temps et déterminer les constantes cinétiques K1, k2, k3 et k4. Ceci nécessite une précision importante dans l'établissement des courbes ce que, seule la sonde grâce à sa résolution temporelle permet d'établir *in vivo*. Ainsi, dans cette étude, les résultats ont montré que K1 et k2 étaient stables tandis que k3 augmentait de plus de 50% sous activation. Cette précision suggère que l'augmentation dans la consommation de [^{18}F]-FDG est due à des variations dans la consommation de glucose au niveau de l'hexokinase et non à des changements au niveau du passage du sang au cerveau.

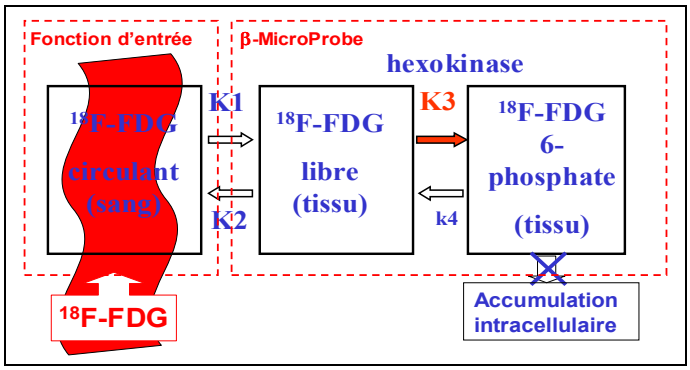


Figure II.10 : *Modèle de Sokoloff – modèle à 3 compartiments/4constantes décrivant le devenir du [^{18}F]-FDG dans l'organisme.*

Dans une approche similaire, la capacité de la β-MicroProbe à détecter une décroissance métabolique a été également démontrée après une lésion produite par injection unilatérale dans le striatum d'un inhibiteur mitochondrial, le malonate. Ce modèle expérimental de lésion métabolique mime l'état précédant la neurodégénération dans la maladie de Huntington. Les enregistrements des 2 sondes implantées chacune dans un striatum ont montré une réduction significative du côté striatum lésé (décroissance de 30% du signal dans le striatum injecté par rapport au striatum témoin 40 min après injection du traceur). L'analyse compartimentale a, quant à elle, dévoilé une diminution de la constante k3 et pas de changements significatifs pour les autres constantes cinétiques entre les 2 striata, marquant donc une baisse de l'activité de l'hexokinase.

II. 2. 2 Mesures quantitatives du débit sanguin cérébral chez le rat

Dans le contexte d'études procédant à une activation cérébrale, la mesure quantitative du débit sanguin cérébral doit le plus souvent être considérée. Ainsi, basé sur le même modèle d'activation - mouvement des vibrisses / stimulation du cortex somatosensoriel - que précédemment, la possibilité de suivre le débit sanguin cérébral à l'aide de sondes de 500 µm a été évaluée après injections successives d'$H_2{}^{15}O$ par une équipe de la Division de Médecine Nucléaire du Centre PET de Zurich [23]. Les données ont été analysées dans ce cas précis en utilisant un modèle à 2 compartiments en condition repos, sous stimulation ainsi qu'après injection d'acetazolamide engendrant la dilatation des vaisseaux sanguins et par conséquent l'augmentation du débit sanguin. Pour résumer, les résultats ont montré la reproductibilité des mesures quantitatives du débit sanguin cérébral dont une augmentation de 43% sous stimulation et 65% sous acétazolamide. Cependant une sous-estimation systématique a été notée en comparaison aux données publiées. Les expérimentateurs ont fait remarquer à juste titre que la prise en compte du champ de vue et de sa modélisation selon les coordonnées stéréotaxiques d'implantation était indispensable.

II. 3 Etudes méthodologiques : mesure de la fonction d'entrée artérielle

Afin d'extraire les constantes cinétiques dans les modèles compartimentaux précédents, il est nécessaire de déterminer avec précision la fonction d'entrée, qui représente la courbe d'activité du traceur dans le sang en fonction du temps. La méthode généralement employée pour l'obtenir consiste à prélever des échantillons sanguins tout au long de

l'expérience puis à effectuer un comptage adapté de l'activité. Cependant, cette procédure soulève plusieurs inconvénients :
¤ une méthodologie lourde pour l'expérimentateur accompagnée d'une exposition répétée à la radioactivité,
¤ une résolution temporelle restreinte à environ 10 s entre chaque échantillon, ce qui limite la précision de la mesure de la fonction d'entrée ainsi que de la modélisation compartimentale associé,
¤ enfin, l'ensemble du volume sanguin prélevé reste important et peut avoir des effets néfastes sur les paramètres physiologiques de l'animal.

Pour pallier ces difficultés et prenant avantage de la haute résolution temporelle de la β-MicroProbe, une alternative a été proposée [24]. Dans ce cas, la mesure s'effectue par une sonde scintillante allongée (environ 6 cm) de 250µm de diamètre introduit dans l'artère fémorale du rat. Une seconde sonde de même diamètre est placée à côté de l'artère pour permettre la soustraction du bruit de fond lié à l'activité provenant du traceur s'accumulant dans les tissus environnants. Ces résultats sont comparés à la fonction d'entrée obtenue par échantillons sanguins, sont présentés figure II.11. Celle-ci illustre clairement l'adéquation entre les 2 courbes et la meilleure résolution temporelle de la sonde avec des données acquises toutes les secondes.

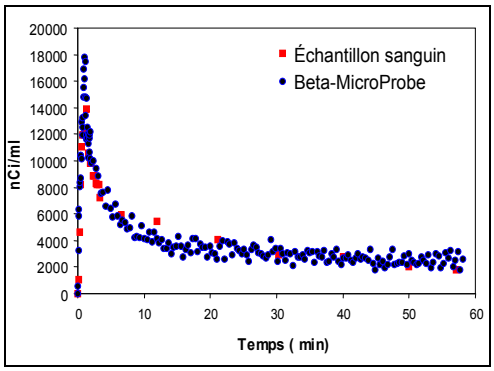


Figure II.11 : *Détermination de la fonction d'entrée artérielle avec la β-MicroProbe comparée avec celle obtenue par échantillons sanguins.*

Cette étude a montré le potentiel de la sonde à mesurer précisément la fonction d'entrée et démontré que l'utilisation de la β-MicroProbe pouvait être une alternative à la prise répétée d'échantillons sanguins chez l'animal. De plus, offrant une grande sensibilité et une haute résolution temporelle, cette technique peut faciliter la détermination quantitative des paramètres cinétiques extraits du modèle compartimental.

II. 4 Etudes en cours de réalisation

II. 4. 1 Etude de l'activité métabolique des glomérules du bulbe olfactif

Comme mentionné précédemment, les signaux détectés en imagerie neurofonctionnelle chez l'homme et le petit animal en IRM et TEP s'appuient sur des variations de paramètres physiologiques comme les variations locales de la consommation de glucose et d'oxygène ou encore du débit sanguin. Or, ces paramètres métaboliques restent bien loin en aval des mécanismes de transmission de l'information nerveuse sous forme de

potentiels d'action et de potentiels synaptiques, rendant délicats l'interprétation des résultats obtenus dans ces études. Dans ce contexte, un projet récent a été entrepris dans le groupe visant à étudier le métabolisme énergétique cérébral au niveau des glomérules du bulbe olfactif, structures modulaires qui constituent la première étape du codage de l'information olfactive par le cerveau. Ces structures sont un modèle idéal pour étudier le couplage neurométabolique, car elles contiennent une population dense en astrocytes stockant du glycogène, un réseau vasculaire spécifique par glomérules et peuvent être facilement activées en présence d'odeur.

Dans ce cadre, l'objectif est d'induire une large échelle d'activation neuronale chez le même animal, en délivrant un stimulus sensoriel odorant sur une large échelle de concentrations et d'étudier localement la concentration de glucose et d'oxygène ainsi que les changements de débit sanguin local à différents niveaux d'activation. Du point de vue technique, la recapture et la phosphorylation du glucose sont évaluées par l'utilisation de la sonde β-MicroProbe. Le protocole expérimental consiste à placer la sonde en surface du bulbe puis d'effectuer, après une première injection de [^{18}F]-FDG, une mesure à l'état repos (sans stimulation). Après 70 min d'acquisition, une odeur précise est délivrée à l'animal suivi d'une seconde injection de [^{18}F]-FDG. Sur la base du modèle de Sokoloff présenté au § II.2.1, les variations de la consommation en glucose lors de l'activation sensorielle peuvent alors être déterminées. Ces mesures seront couplées aux mesures de la consommation en oxygène par une technique d'optique du signal intrinsèque (IOSI) ainsi qu'aux mesures de variations du débit sanguin par laser-doppler. Le couplage de ces techniques permettra d'accéder à des informations complémentaires pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au complexe neuro-énergétique.

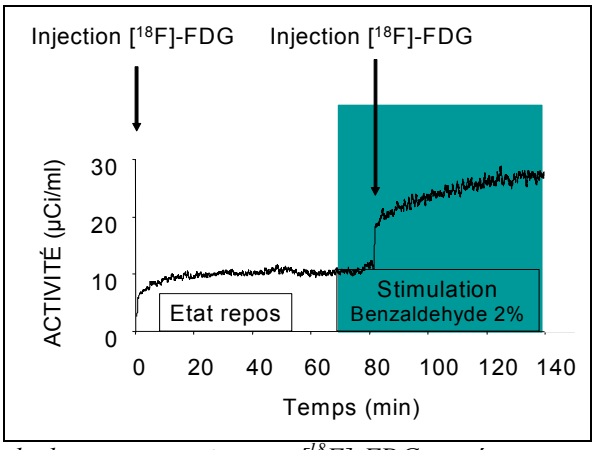


Figure II.12 : *Mesure de la consommation en [^{18}F]-FDG en état repos puis après stimulation olfactive.*

II. 4. 2 Etude chez le rat éveillé et libre de ses mouvements

La mesure chez l'animal éveillé présente l'intérêt d'une part, de s'affranchir des biais expérimentaux introduits par l'anesthésie et d'autre part, si l'animal est laissé libre de ses mouvements, de permettre la réalisation d'études comportementales simultanées à l'enregistrement de cinétiques de fixation de molécules radiomarquées. En ce sens, un programme de recherche a été initié par l'URA2210 du SHFJ d'Orsay par L. Besret et M. Guillermier en collaboration avec le groupe IPB. Les premiers tests ont été réalisés chez 6 rats pendant plusieurs semaines sur la base d'injections répétées de [^{18}F]-FDG. Pour les

besoins de cette expérience longitudinale, les rats ont été implantés de façon chronique avec des sondes de 500 µm, placées dans le striatum (Fig. II. 13). De même, un cathéter implanté à demeure dans la jugulaire permet l'injection du traceur. Les sondes n'étant pas protégées de la lumière (pour limiter les risques inflammatoires), les tests sont réalisés avec les animaux plongés dans l'obscurité (cage recouverte d'un drap noir) et laissés éveillés durant l'acquisition (les animaux ont pour cela été préalablement habitués à leur environnement pour favoriser leur immobilité). Les résultats obtenus au-delà de 2 mois ont montré une stabilité dans l'intensité du signal observé, supposant qu'il n'existe pas de réactions inflammatoires fortes susceptibles de rendre les sondes implantées inopérantes dans le temps. Ce travail est le premier montrant la faisabilité d'une étude longitudinale chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements permettant à terme d'étudier, sur des modèles animaux de maladies neurodégénératives, par exemple la variation du métabolisme énergétique et tester l'efficacité de traitements médicamenteux ou chirurgicaux.

Figure II.13 : *Images d'un rat présentant une sonde implantée à demeure dans le striatum avant mesure de la consommation de [^{18}F]-FDG chez l'animal éveillé.*

II. 5 Conclusion et perspectives

La β-MicroProbe s'est avérée être une alternative aux mesures TEP. Au-delà de l'effective validation de la sonde dans un contexte biologique, les diverses études menées par différents groupes internationaux ont permis de démontrer le potentiel propre de la β-MicroProbe à quantifier des paramètres cinétiques tant dans un cadre pharmacologique, fonctionnel que méthodologique. Elles ont mis en lumière les atouts de la sonde par rapport aux autres techniques d'études *in vivo* notamment une excellente résolution temporelle autorisant des mesures précises de variations métaboliques ainsi que des modélisations compartimentales rigoureuses. N'offrant pas d'images comme le font la plupart des tomographes sur corps entier, son implantation *in situ* offre une sensibilité supérieure à celles des tomographes. L'insertion stéréotaxique des sondes dans les tissus s'effectue d'une manière similaire à celle utilisée en microdialyse, couramment employée en biologie. L'aspect invasif de la sonde ne perturbe pas le comportement de l'animal et rend possible des études chroniques répétées sur un même animal, éveillé et libre de ses mouvements. Un point reste à approfondir pour protéger la sonde de la lumière. Une équipe suisse a d'ores et déjà appliqué un fin dépôt homogène métallique sur la sonde pour rendre la sonde opaque à la lumière [25]. L'évaluation de la sensibilité résultante est actuellement en cours tant du point de vue physique que biologique. Enfin, la β-MicroProbe s'avère également être un détecteur souple, peu onéreux et relativement facile à coupler avec d'autres modalités dédiées aux études *in vivo* chez le petit animal. Ce dernier point nous permet de proposer une alternative au couplage TEP/RMN (cf. chap.I) en combinant la β-MicroProbe aux techniques magnétiques. La faisabilité du couplage d'un point de vue physique et biologique feront ainsi l'objet du chapitre III et IV respectivement.

Références

[1] S. Derenzo, "Precision Measurement of annihilation point spread distribution for medically important positron emitters," presented at 5th int Conf Positron Annihilation, Japan, 1979.

[2] G. Paxinos and C. Watson. "The rat brain in stereotaxic coordinates" *Academic Press*.

[3] A. Desbrée, P. F. Pain, H. Gurden, L. Pinot, D. Grenier, L. Zimmer, R. Mastrippolito, and P. Lanièce. "A new multimodality system for quantitative in vivo studies in small animals: combination of Nuclear Magnetic Resonance and the radiosensitive beta-MicroProbe" *IEEE TNS*, sous presse.

[4] F. Pain. "Développement d'une sonde radiosensible intracérébrale pour la mesure in vivo de ligands radiomarqués chez le rongeur" *Thèse de l'université de caen*, 2000.

[5] F. Pain, P. Lanièce, R. Mastrippolito, Y. Charon, D. Comar, V. Leviel, J. Pujol, and L. Valentin. "SIC, an intracerebral radiosensitive probe for in vivo neuropharmacology investigations in small laboratory animals : theoretical considerations and physical characteristics" *IEEE TNS*, vol. 47, pp. 25-32, 2000.

[6] C. Woody, S. Stoll, D. Schlyer, M. Gerasimov, P. Vaska, S. Shokouhi, N. Volkow, J. Fowler, and S. Dewey. "A study of scintillation beta microprobes" *IEEE TNS*, vol. 49, pp. 2208-2212, 2002.

[7] G. Apollinari and al. "Plastic optical fiber splicing by thermal fusion" *NIM*, vol. A387, pp. 186-193, 1992.

[8] Pain F, Lanièce P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Leviel V, Pujol JF, and V. L. "SIC, an intracerebral radiosensitive probe for in vivo neuropharmacology investigations in small laboratory animals : first prototype design characterisation and in vivo evaluation" *IEEE TNS*, vol. 49, pp. 822-826, 2002.

[9] L. Zimmer, G. Fournet, B. Joseph, G. Guillaumet, and D. Le Bars. "Carbon-11 labelling of 8{{3-[4-(2-[11C]methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl}oxy}thiochroman, a presynaptic 5-HT1A receptor agonist, and its in vivo evaluation in anaesthetised rat and awake cat" *Nucl Med Biol*, vol. 30, pp. 541-546, 2003.

[10] L. Zimmer, W. Hassoun, F. Pain, F. Bonnefoi, P. Lanièce, R. Mastrippolito, L. Pinot, J. Pujol, and V. Leviel. "SIC, an intracerebral Beta range sensitive probe for radiopharmacology investigations in small laboratory animals : binding studies with [11C]-Raclopride" *J Nucl Med*, vol. 43, pp. 227-233, 2002.

[11] N. Ginovart, W. Sun, A. Wilson, S. Houle, and S. Kapur. "Quantitative validation of an intracerebral B-sensitive microprobe system to determine in vivo drug-induced receptor occupancy using [11C]raclopride in rats" *Synapse*, vol. 52, pp. 89-99, 2004.

[12] Zimmer L, Pain F, Mauger G, Plenevaux A, Le Bars D, Mastrippolito R, Pujol JF, Renaud B, and L. P. "The potential of the Beta-MICROPROBE, an intracerebral radiosensitive probe, to monitor the [18F]-MPPF binding in the rat dorsal raphe nucleus" *Eur J Nucl Med*, vol. 29, pp. 1237-1247, 2002.

[13] L. Zimmer, G. Mauger, D. Le Bars, G. Bonmarchand, A. Luxen, and J. Pujol. "Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-hT1A PET ligand 18F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis" *J Neurochem*, vol. 80, pp. 278-286, 2002.

[14] K. Niwa, K. Kazama, S. Younkin, G. Carlson, and C. Iadecola. "Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein" *Neurobiol Dis*, vol. 9, pp. 61-68, 2002.

[15] D. Ingvar and G. Franzen. "Distribution of cerebral activity in chronic schizophrenia" *Lancet.*, vol. 2, pp. 1494-1486, 1974.

[16] Pain F, Besret L, Vaufrey F, Grégoire MC, Pinot L, Gervais P, Ploux L, Bloch G, Mastrippolito R, Lanièce P, and Hantraye P. "In vivo quantification of localized neuronal activation and inhibition in the rat brain using a dedicated high temporal resolution Beta-sensitive MICROPROBE" *PNAS*, vol. 99, pp. 10807-10812, 2002.

[17] N. Cholet, J. Seylaz, P. Lacombe, and G. Bonvento. "Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition" *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 17, pp. 1191-1201, 1997.

[18] G. Bonvento, N. Cholet, and J. Seylaz. "Sustained attenuation of the cerebrovascular response to a 10 min whisker stimulation following neuronal nitric oxide synthase inhibition" *Neurosci Res*, vol. 37, pp. 163-166, 2000.

[19] Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, DesRosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada D, and Shinohara M. "the [14C]Deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat" *J Neurochem*, vol. 28, pp. 897-916, 1977.

[20] Reivich M, Kuhl D, Wolf A, Greenberg J, Phelps M, Ido T, Casella V, Fowler J, Hoffman E, Alavi A, Som P, and Sokoloff L. "The [18F]Fluorodeoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization in Man" *Circ Res*, vol. 44, pp. 127-137, 1979.

[21] Y. Nakao, Y. Itoh, T. Kuang, M. Cook, J. Jehle, and S. L. "Effects of anesthesia on functional activation of cerebral blood flow and metabolism" *PNAS*, vol. 98, pp. 7593-7598, 2001.

[22] H. Kornblum, D. Araujo, A. Annala, K. Tatsukawa, M. Phelps, and S. Cherry. "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET)" *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, pp. 655-660, 2000.

[23] B. Weber, N. Spath, M. Wyss, D. Wild, C. Burger, R. Stanley, and A. Buck. "Quantitative cerebral blood flow measurements in the rat using a beta-probe and H2 15O" *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 23, pp. 1455-1460, 2003.

[24] F. Pain, P. Laniece, R. Mastrippolito, P. Gervais, P. Hantraye, and L. Besret. "Arterial input function measurement without blood sampling using a beta-microprobe in rats" *J Nucl Med*, vol. 45, pp. 1577-1582, 2004.

[25] B. Weber, N. Späth, M. Wyss, D. Wild, C. Burger, R. Stanley, and A. Buck. "Quantitative cerebral blood flow measurements in the rat using a beta-probe and $H_2{}^{15}O$" *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 23, 2003.

Chapitre III

Couplage de la β-MicroProbe et de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : aspects physiques

La communauté scientifique a commencé à s'intéresser au parcours des positons dans les champs magnétiques, dans un premier temps pour améliorer la résolution spatiale des imageurs TEP en réduisant le parcours des positons [1, 2]. Par la suite, elle s'est intéressée à la combinaison des méthodes TEP et des variantes de la RMN, comme l'IRMa, l'IRMf ou la SRM dans la mesure où elle permettrait, au-delà de la localisation anatomique des organes, d'obtenir et de corréler en temps des données fonctionnelles et métaboliques complémentaires. Cependant, ces tentatives sont pour le moment restées infructueuses ou partielles eu égard à la complexité de faire fonctionner la technologie nécessaire à l'imagerie nucléaire dans un aimant (§I. 7. 3.).

Les caractéristiques physiques de la sonde radiosensible β-MicroProbe et la variété des expériences biologiques réalisées avec celle-ci ont été développées dans le chapitre précédent. Celles-ci ont démontré les potentialités de la sonde pour les études *in vivo* chez le petit animal. Ces études ont notamment confirmé que la β-MicroProbe pouvait être une alternative aux mesures TEP. S'appuyant sur les côtés amagnétiques et la simplicité de mise en oeuvre de la sonde, nous nous sommes proposés de coupler cette dernière avec les techniques magnétiques afin d'obtenir des paramètres biologiques complémentaires *in vivo* sur un même animal. Pour tester la faisabilité de ce couplage, nous avons évalué la capacité de la sonde à quantifier des concentrations radioactives sous champ magnétique intense. Ce chapitre est consacré à cette évaluation.

A cette fin, nous avons déterminé dans un premier temps, par simulation, l'influence du champ magnétique sur la trajectoire des positons. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'influence d'un champ magnétique de 7-T sur les paramètres définissant la sonde. Ainsi, après caractérisation du Volume de Détection de la sonde sous champ par simulation Monte Carlo, la sensibilité de détection et le rendement lumineux de la sonde ont été théoriquement et expérimentalement évalués et discutés.

Sur la base des résultats obtenus, nous avons étudié la possibilité de réaliser le couplage de la sonde et des techniques magnétiques dans un contexte biologique, études qui seront l'objet du chapitre IV.

I Influence du champ magnétique sur la trajectoire des positons

Cette partie est dédiée à la simulation, à l'aide du code Monte Carlo Geant4, du parcours des positons issus de la désintégration radioactive d'isotopes couramment utilisés en médecine nucléaire, que sont le ^{18}F, le ^{11}C et l'^{15}O, dans le milieu d'intérêt. Après avoir décrit les caractéristiques du code de simulation utilisé, nous présentons l'influence de champs magnétiques de 3-T et 7-T sur la trajectoire des positons. Cette étude préalable nous permet d'aborder l'impact du champ sur l'activité détectée par la sonde.

I. 1 Description du programme de simulation Geant4

Les simulations Monte Carlo[1] ont été réalisées avec le code Geant4 (**GE**ometry **AN**d Tracking), développé au CERN à Genève. Le logiciel Geant4 [1] est un outil de simulation des particules dans la matière, initialement dédié à la physique des hautes énergies et qui a également montré son intérêt dans la recherche biomédicale [2, 3, 4]. Depuis 1998, la collaboration Geant4 regroupant plus de 100 scientifiques dans plus de 10 expériences dans le monde assure la maintenance et l'amélioration du code en lien avec les utilisateurs, permettant la pérennité du code. Par rapport à d'autres codes de simulation Monte Carlo (MCNP, EGS, Penelope) utilisés dans les domaines d'application de la physique médicale, Geant4 a l'avantage d'être basé sur une technologie orientée objet, implémenté en C++, permettant d'intégrer ou de modifier des modules plus aisément sans perturber l'architecture de base du code. De plus, ce code prend en compte les processus électromagnétiques de basses énergies telles que ceux mis en oeuvre dans les expériences impliquant des radiotraceurs. Enfin, il permet de simuler assez facilement des champs magnétiques intenses et de visualiser les trajectoires et interactions des particules via différentes interfaces graphiques (Dawn, OpenGL, …).

Le schéma III. 1 illustre la structure de base de l'architecture du code. Celui-ci nécessite au minimum trois classes comprenant la description de la géométrie et des propriétés du système (*G4VUserDetectorConstruction*), les processus physiques mis en jeu (*G4VUserPhysicsList*) et la génération des particules primaires (*G4VUserPrimaryGeneratorAction*). Ces trois modules seront plus particulièrement détaillés dans le cadre précis de notre étude dans les paragraphes I.1.1, I.1.2, I.1.3 respectivement. Au-delà de cet axe central, des classes peuvent être appelées pour détailler des informations sur chaque pas de la trajectoire d'une particule (*G4UserSteppingAction*), sur un évènement individuel (*G4UserEventAction*), sur l'ensemble des trajectoires des particules (*G4UserRunAction*) ou au niveau de la partie sensible du détecteur (*G4TrackerHit et G4TrackerSD*). De même, une classe peut être implémentée pour la visualisation (*G4VisManager*). Dans notre cas, un autre module va nous permettre de simuler le champ magnétique (*G4UniformMagField*).

[1] Les méthodes Monte Carlo sont des méthodes statistiques basées sur le tirage de nombres aléatoires suivant des lois de probabilité. Ils sont utilisées pour résoudre des problèmes mathématiques ou physiques complexes dans les cas où des calculs analytiques ne peuvent apporter de solutions. Dans le cas de problèmes liés au transport radiatif, le suivi d'une particule est caractérisé par une succession d'étapes au cours desquelles la particule peut subir différents évènements a priori (collision, diffusion, effet photoélectrique, …). L'histoire de la particule est alors déterminée par tirages aléatoires où les probabilités élémentaires de chacun des évènements, qui définissent l'interaction de la particule avec la matière, sont connues individuellement.

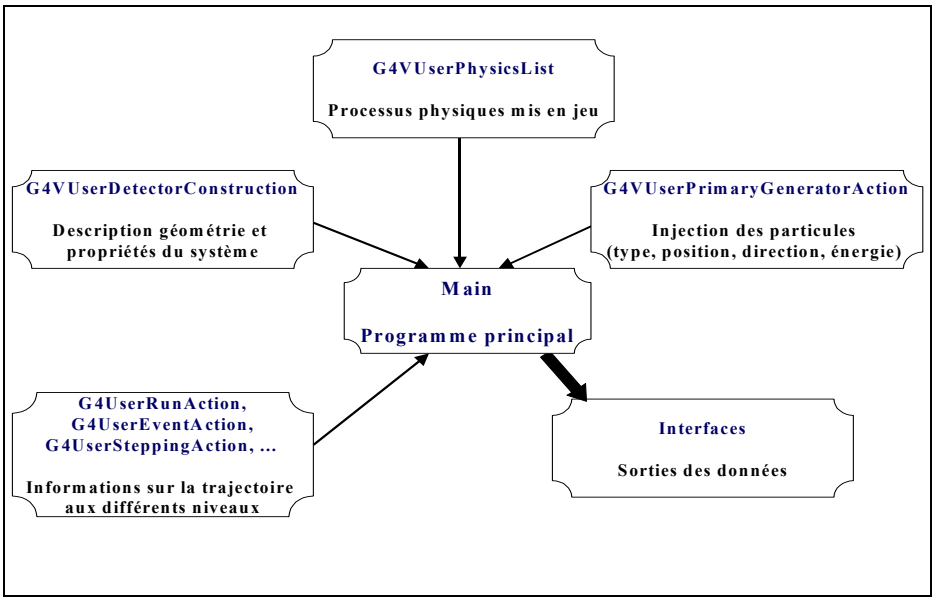


Figure III.1 : *Schéma de la structure de base du code Geant4.*

I. 1. 1 Description de la géométrie et propriétés du système

Dans Geant4, les matériaux du système sont définis dans le fichier "DetectorConstruction" selon trois paramètres : la densité, la masse molaire et la fraction massique par élément atomique. Dans notre cas, les différents matériaux suivants seront considérés :

¤ le milieu est composé d'eau ou de tissus cérébraux,
¤ le polystyrène compose le cœur de la fibre,
¤ le cladding entourant la fibre est en polymethyl methacrylate (PMMA),

Les différents paramètres ont été tirés du National Institute of Standards and Technology [3].

La description de la géométrie s'effectue d'abord par la définition d'une région mère, le "World", qui englobe l'ensemble des volumes décrits dans la géométrie considérée. Puis, trois étapes caractérisent la création des volumes "fils":

(1) Description du *volume solide* : il définit la forme et les dimensions de l'objet.

(2) Description du *volume logique* : à ce niveau, on peut avoir accès au matériau dont est composé l'objet ou au comportement sensible du détecteur.

(3) Description du *volume physique* : il représente la position spatiale du volume logique au sein du volume mère.

Dans notre étude, la partie scintillante de la β-MicroProbe est modélisée par un cylindre représentant le cœur en polystyrène. Ce cœur est défini comme un détecteur sensible. Ceci signifie que l'on a la possibilité de connaître en détail les interactions ayant lieu dans ce volume. Ce cylindre est compris dans un autre cylindre représentant le cladding en PMMA. Le tout constitue une fibre de 1 mm de longueur et de 0.25, 0.5 ou 1.0 mm de diamètre, dont 4% du diamètre est composé du cladding. De même, une partie non sensible représentant la fibre claire est accolée à la fibre scintillante, possédant la même constitution et de même diamètre que celle-ci. La partie claire a une longueur de 6 mm.

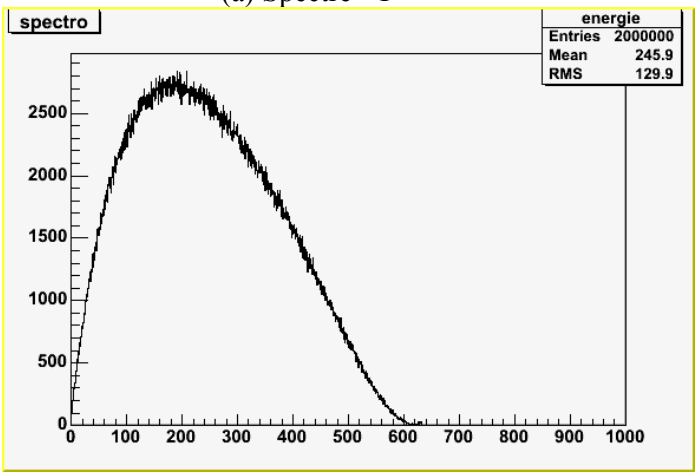
I. 1. 2 Génération des évènements

Pour générer des particules primaires, les paramètres suivants doivent être définis :

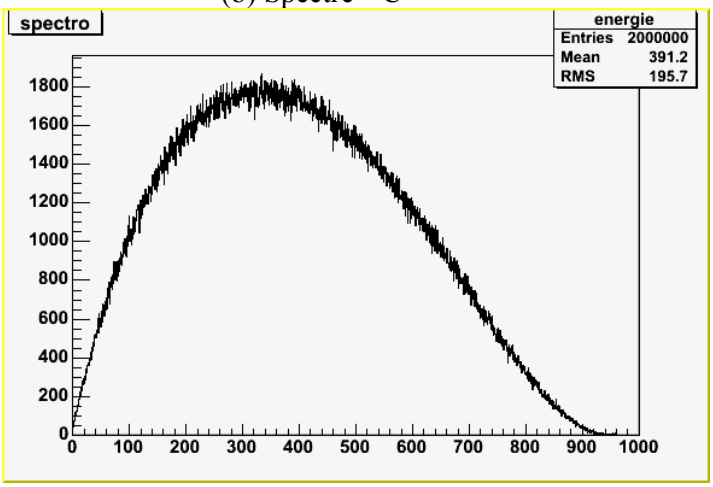
- le type de particules,
- la direction d'émission des particules,
- la position d'où les particules vont être tirées,
- l'énergie cinétique des particules.

Dans ce chapitre, les particules primaires sont des positons (exception faite du paragraphe I. 2. 2 où les particules seront alors des électrons). Chaque particule est émise dans un angle solide de 4Π. Pour chaque étude, la position d'émission sera explicitée dans les paragraphes dédiés. En ce qui concerne l'énergie des particules, différents spectres β^+ ont été reproduits à savoir le ^{18}F, le ^{11}C et l' ^{15}O. Pour cela, les données spectrales obtenues à partir du code SPEBETA [4] ont été ajustées, pour chaque spectre, avec une équation polynomiale f(E) d'ordre au moins 5. Les énergies sont ensuite tirées aléatoirement et les énergies ne satisfaisant pas à l'allure du spectre seront rejetées. Les spectres générés selon ce principe sont présentés figure III.2.

(a) Spectre ^{18}F



(b) Spectre ^{11}C



(c) Spectre ^{15}O

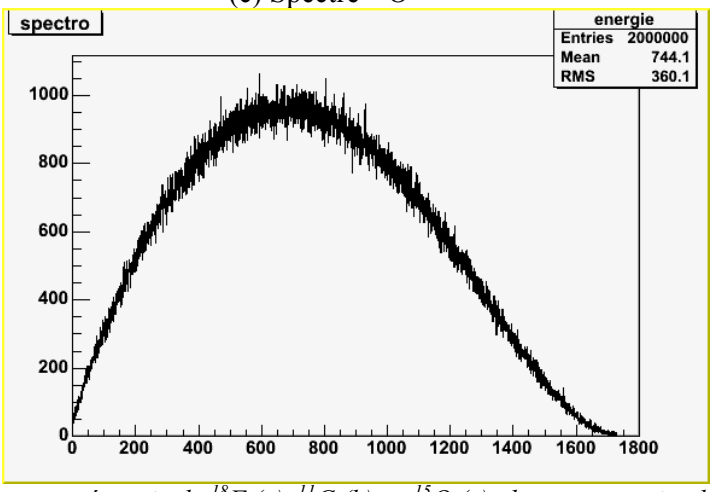


Figure III.2 : *Spectres en énergie du ^{18}F (a), ^{11}C (b) et ^{15}O (c) obtenues par simulation.*

	Energie maximum		**Energie moyenne**	
Isotope	*Table [5]*	*Simulée*	*Table [5]*	*Simulée*
^{18}F	633	633	249	246
^{11}C	960	959	385	391
^{15}O	1732	1730	735	744

Tableau III.1 : *Comparaison des énergies maximum et moyennes issues des tables et pour les différents isotopes β étudiés.*

Les énergies maxima et moyennes des différents spectres ont été comparées aux données tabulées [5] et sont présentées Tableau III.1. On peut voir que les valeurs simulées sont en accord avec les tables.

I. 1. 3 Processus physiques

Parmi les processus électromagnétiques, une liste de processus physiques peut être appliquée pour chaque type de particule. On retrouve ainsi les processus standards pour les électrons, positons, photons et hadrons pour des énergies allant de 1 keV à plus de 100 GeV suivant les processus. L'effet Cerenkov ou les processus optiques peuvent également être modélisés [6, 7].

A chaque pas[2], tous les processus listés sont invoqués pour déterminer la distance parcourue avant la prochaine interaction. Le pas minimum peut être imposé soit par une limite géométrique rencontrée sur la trajectoire, soit par un des processus physiques, soit par l'utilisateur. Afin d'obtenir des données sur une distance minimale et un temps de calcul raisonnable, le pas a été fixé à 100 µm.

[2] Distance minimale parcourue avant de pouvoir renseigner l'utilisateur sur les interactions subies par la particule (perte d'énergie, durée du processus, …).

Dans notre cas, les processus électromagnétiques implémentés pour le positon sont : les diffusions multiples, l'ionisation, le bremsstrahlung et l'annihilation. Les photons de 511 keV issus de l'annihilation ne sont pas suivis puisqu'ils constituent dans notre application un bruit de fond négligeable.

I. 2 Validation du code de simulation Geant4

Afin d'analyser la fiabilité et la précision de notre simulation sous Geant4, nous avons comparé le parcours des positons simulé avec Geant4 et simulé avec le code Monte Carlo MCNP version 4C[3] [8, 9]. Dans ce but, nous avons considéré une source ponctuelle de ^{18}F et de ^{11}C dans des tissus cérébraux [10] ou dans de l'eau. Dans chacun des cas cités, nous avons déterminé la distribution de probabilité d'annihilation radiale en fonction de la distance au point d'émission. Sur la base de précédents travaux [11, 12], les différentes distributions ont été ajustées avec la fonction P(x) suivante :

$$P(x) = A\, e^{-k1\, x} + (1-A)\, e^{-k2\, x} \qquad x \geq 0 \qquad \text{(III.1)}$$

où les paramètres ajustés A, k1 et k2 dépendent des trois isotopes et x est la distance radiale au point d'émission.

La figure III.3 présente l'exemple, pour le ^{18}F, des distributions de probabilité d'annihilation radiale en fonction de la distance au point d'émission obtenues avec MCNP et avec Geant4. A partir de la fonction P(x), la largeur à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum = FWHM) ainsi que la largeur au 1/10ème de la hauteur (Full Width at Tenth of Maximum = FWTM) ont été calculées et sont présentées Tableau III. 2.

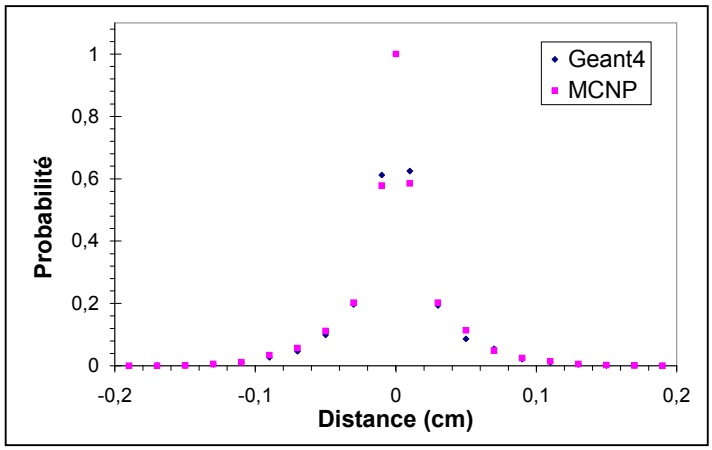


Figure III.3 : *Distribution de probabilité d'annihilation radiale en fonction de la distance au point d'émission (mm) pour une source ponctuelle de ^{18}F dans les tissus cérébraux (normalisée à 1.0 à la distance 0).*

[3] Pour décrire les déflections angulaires et la perte d'énergie des particules chargées, le code MCNP traite le transport et les interactions des particules β selon des modèles semi-analytiques de diffusions multiples.

	FWHM (mm)		FWTM (mm)	
	Geant4	**MCNP**	**Geant4**	**MCNP**
^{18}F	0.27	0.26	0.94	0.99
^{11}C	0.19	0.21	1.57	1.50

Tableau III.2 : *FWHM et FWTM calculés pour une source de ^{18}F et de ^{11}C dans les tissus cérébraux en utilisant les deux codes Monte Carlo MCNP et Geant4.*

Les résultats sont en bon accord pour les différents isotopes selon les deux approches. Cette étude confortant la fiabilité de notre simulation Monte Carlo, nous allons à présent centrer nos simulations sur l'effet du champ magnétique sur le parcours des positons.

I. 3 Simulation de l'influence de champs magnétiques intenses sur les positons

Sur la base des données comparables obtenues avec les deux codes de simulation Monte Carlo, l'étape suivante est consacrée à l'étude de l'impact d'un champ magnétique intense sur la trajectoire des positons pour les différents isotopes étudiés. L'influence de champs magnétiques de 3 et 7 Tesla a été plus particulièrement étudiée [13]. Ces valeurs sont représentatives des limites inférieure et supérieure de la gamme d'intensité des champs magnétiques couramment exploités en IRM chez le petit animal. Dans un premier temps, nous décrirons brièvement les équations du mouvement d'une particule chargée dans un champ magnétique uniforme. Puis, dans un second temps, nous nous intéresserons à l'évaluation du parcours des positons sous champ. Enfin, l'activité détectée par la sonde sous champ sera déterminée donnant une première réponse sur la possibilité théorique d'utiliser la sonde dans un aimant haut champ.

I. 3. 1 Influence du champ magnétique sur les particules chargées relativistes

On peut rappeler que pour une charge unique q avec une vitesse $\vec{v}$ dans un champ magnétique $\vec{B}$, la force est :

$$\vec{F} = q\,(\,\vec{v} \wedge \vec{B}\,) \qquad \text{(III.2)}$$

Pour une vitesse quelconque, la force est égale à $d\vec{p}/dt$. En écrivant que $\vec{p} = m_0\,\vec{v}/\sqrt{1-v^2/c^2} = \gamma\, m_0\,\vec{v}$ avec $\gamma = 1/\sqrt{1-v^2/c^2}$, on trouve que l'équation relativiste du mouvement est :

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{m_0\,\vec{v}}{\sqrt{1-v^2/c^2}}\right) = \frac{d}{dt}(\gamma\, m_0\,\vec{v}) = \vec{F} = q\,(\,\vec{v} \wedge \vec{B}\,) \qquad \text{(III.3)}$$

Dans le cas général, le mouvement d'une particule dans un champ magnétique uniforme et un champ électrique nul, comporte une composante de vitesse constante parallèle à $\vec{B}$ et un mouvement circulaire normal à $\vec{B}$ - la trajectoire est une hélice cylindrique d'axe parallèle à $\vec{B}$ (Fig.III.4).

Le rayon de l'hélice est donné par :

$$R = \frac{p_{\perp}}{qB} = \gamma \frac{m v_{\perp}}{qB} \quad > \text{ Rayon classique} \qquad \text{(III.4)}$$

avec p, composante de l'impulsion normale au champ.

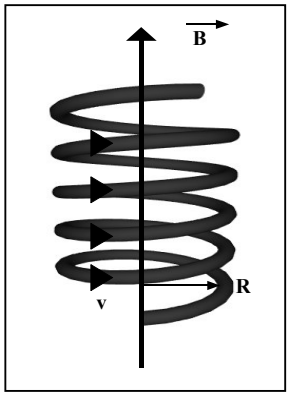


Figure III.4 : *Mouvement d'une particule chargée dans un champ magnétique uniforme.*

Ce cas très particulier (dans le vide) est évidemment plus complexe dans les tissus où les processus tels que diffusion ou ionisation entraînent des pertes d'énergie et des changements de trajectoires. Néanmoins, on s'attend à observer une réduction du parcours des positons dans les directions perpendiculaires au champ magnétique.

I. 3. 2 Simulation Geant4 du parcours des positons sous champ magnétique

Afin d'évaluer la capacité de la β-MicroProbe à enregistrer des concentrations radioactives dans un champ magnétique intense, nous avons étudié l'effet de différents champs magnétiques sur la trajectoire des positons.

A cette fin, des sources ponctuelles de ^{18}F, ^{11}C et ^{15}O ont été dans un premier temps simulées dans les tissus cérébraux sans champ magnétique et en présence d'un champ magnétique de 3-T et 7-T. Un exemple de la déformation obtenue lors de l'application du champ magnétique sur le volume défini par l'ensemble des trajectoires des positons émis sur le spectre du ^{11}C est présenté figure.III.5. Comme attendu, on peut voir que plus le champ magnétique est important, plus le volume de détection dans les plans perpendiculaires à ce champ est rétréci. Le volume sphérique dû à l'isotropie de l'émission des particules et du milieu environnant devient ellipsoïdal. En effet, les positons sont soumis à la force de Lorentz, qui courbe la trajectoire des particules chargées perpendiculairement au champ avec un rayon qui décroît avec le champ et qui augmente avec la vitesse (éq. III. 4).

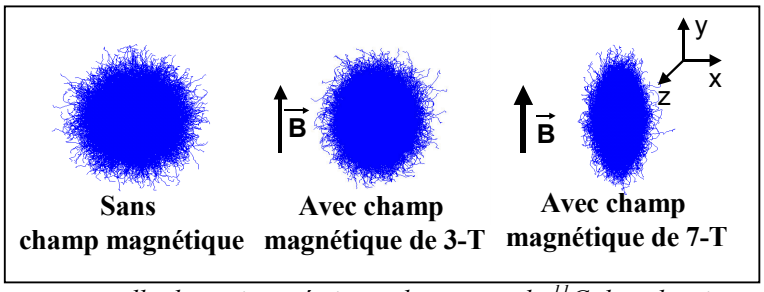


Figure III.5 : *Source ponctuelle de positons émis sur le spectre du ^{11}C dans les tissus cérébraux sous un champ magnétique de 0-T, 3-T et 7-T.*

Dans un second temps, la réduction de ce volume sous champ a été quantitativement évaluée en estimant le volume ellipsoïdal V obtenu tel que V = 4/3πabc, avec a, b, c correspondant aux distances maximales où les positons ont déposé leur énergie, dans les trois directions de l'espace x, y et z respectivement. Le tableau III.3 donne en mm^3 les volumes ellipsoïdaux obtenus pour les trois différents isotopes à 0-T, 3-T et 7-T.

	^{18}F	^{11}C	^{15}O
0-T	20.5	145.3	1238.5
3-T	17.1	108.4	572.7
7-T	10.0	35.2	190.8

Tableau III.3 : *Volume ellipsoïdal (mm^3) dans lequel tous les positons émis d'une source ponctuelle de ^{18}F , ^{11}C ou ^{15}O ont déposé leur énergie en présence d'un champ magnétique de 0-T, 3-T et 7-T.*

En raison de la courbure de la trajectoire des positons sous champ magnétique, on observe effectivement une réduction du volume avec l'augmentation de l'intensité du champ magnétique. En effet, on obtient une réduction allant jusqu'à un facteur de 85% à 7-T par rapport au volume sans champ magnétique. Sur la base de ces résultats, il est donc effectif que le champ magnétique aura un impact sur le volume de détection de la sonde tout particulièrement à 7-T. Cependant, la question naturelle qui se pose est alors de savoir si cet impact affecte la sensibilité de détection de la sonde et si, son utilisation reste pertinente pour quantifier les concentrations radioactives présentes dans les régions cérébrales d'intérêt sous champ magnétique. Ceci impose de considérer non plus une source ponctuelle dans nos simulations, mais de considérer l'ensemble du champ de vue dans lequel tout positon est susceptible d'interagir avec la sonde.

I. 3. 3 Simulation de l'activité détectée par la sonde sous champ magnétique

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'influence d'un champ magnétique intense sur les paramètres de la sonde, nous avons déterminé par simulation l'activité détectée par une sonde de 500 µm de diamètre dans des tissus cérébraux. Cette dernière est plongée dans un champ magnétique de 0-T, 3-T et 7-T. Les coordonnées d'origine des positons émis sur les spectres du ^{18}F, du ^{11}C et de l'^{15}O sont tirées aléatoirement et de façon isotrope dans un cylindre, en excluant le volume de la sonde (Fig. III.6). Considérant une concentration

homogène de 100 Bq/mm^3 avec un rayon variant de 0.25 mm à respectivement 3.0, 3.5 et 6.0 mm pour le ^{18}F, le ^{11}C et l'^{15}O, l'activité détectée par la fibre scintillante est alors déterminée en coups par seconde (cps) en fonction de chaque rayon pour chaque isotope et chaque champ (Fig. III.7 (a)-(c)).

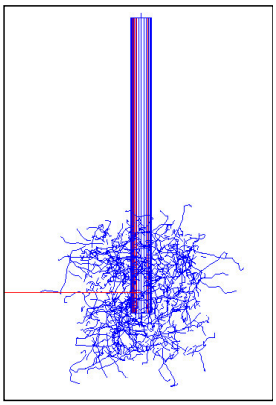
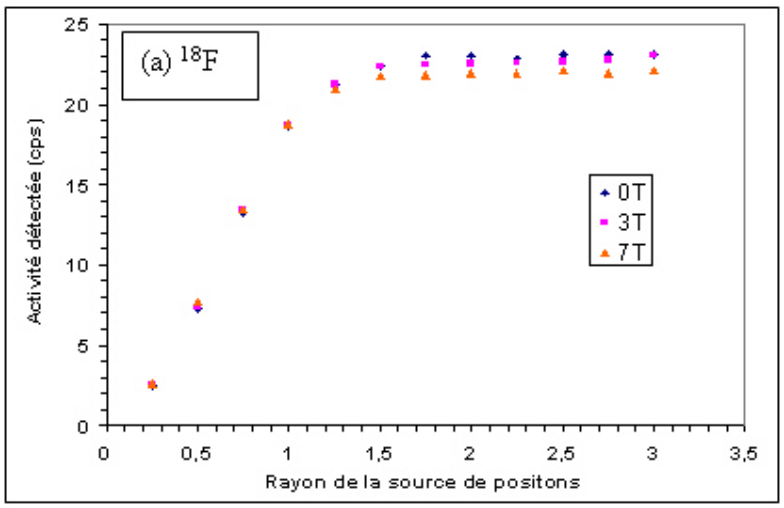
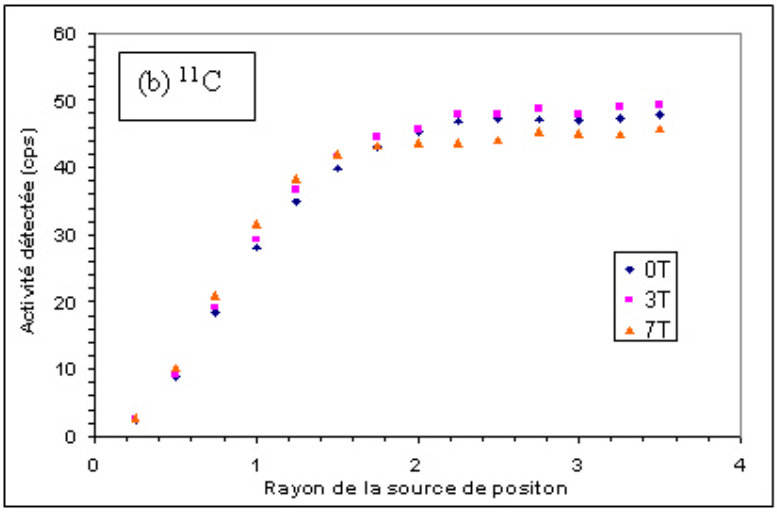


Figure III.6 : *Simulation d'une β-MicroProbe plongée dans une source cylindrique de ^{11}C (en fines lignes bleues) dans des tissus cérébraux sans champ magnétique.*

Les différentes figures montrent que l'activité détectée augmente avec le rayon et atteint un plateau de saturation lié aux effets d'angle solide et au ralentissement progressif des particules dans les tissus. En effet, les particules émises au-delà d'un certain rayon (lorsque l'on est sur le plateau) ne contribuent plus au signal. Notons que 90% du signal est finalement détecté dans un rayon faible par rapport au rayon maximum pour lequel un positon peut interagir avec la sonde.





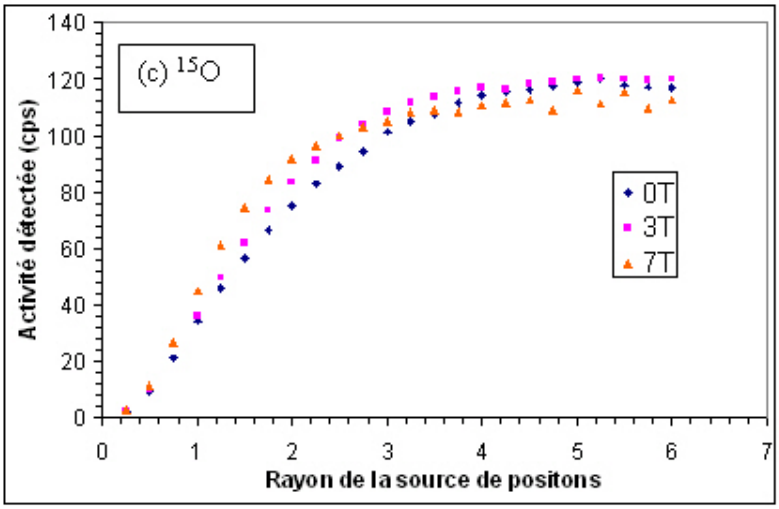


Figure III.7 : *(a) Activité détectée versus rayon de la source de positons pour le ^{18}F à 0, 3 et 7-T. (b) Activité détectée versus rayon de la source de positons pour le ^{11}C à 0, 3 et 7-T. (c) Activité détectée versus rayon de la source de positons pour le ^{15}O à 0, 3 et 7-T.*

Afin de comparer les différences d'activités détectées pour les trois champs, nous avons considéré que la sonde était plongée dans un bécher avec un volume supérieur au volume de détection, c'est-à-dire lorsque les positons émis loin de la sonde ne contribuent plus au signal (plateau de saturation), pour les trois isotopes à 0-T, 3-T et 7-T. Puis, nous avons calculé le rapport entre l'activité détectée sous champ et l'activité détectée sans champ. Ces rapports sont indiqués Tableau III.4.

	^{18}F	^{11}C	^{15}O
Rapport 3-T / 0-T	0.99 (0.02)	1.02 (0.02)	1.01 (0.01)
Rapport 7-T / 0-T	0.96 (0.02)	0.95 (0.02)	0.95 (0.02)

Tableau III. 4 : *Rapport des activités détectées avec champ magnétique et sans champ pour le ^{18}F, le ^{11}C et l'^{15}O (erreurs relatives entre parenthèses).*

On notera qu'en prenant en compte les erreurs relatives, les différences d'activité détectée ne sont pas significatives à 3-T. Schématiquement, il semblerait donc qu'un compromis s'opère entre les particules les plus lointaines qui auraient atteint la fibre sans champ magnétique mais qui ne l'atteignent pas en raison de la courbure de leur trajectoire et inversement, les particules les plus proches de la fibre qui n'auraient pas interagi sans champ et qui interagissent suite à la courbure de leurs trajectoires. A 7-T, une légère diminution de l'activité détectée commence à apparaître par rapport à l'activité qui aurait été détectée à 0-T. En fait, plus le champ est intense, plus le rayon de courbure est petit (éq. III.4). On en déduit que l'effet le plus important devient ici la réduction du volume de détection et que les positons les plus éloignés qui aurait touché la sonde sans champ, ne sont plus du tout détectés à 7-T. On peut également noter que pour les particules les plus énergétiques (notamment ^{11}C et ^{15}O), les variations d'activité détectée sont plus accentuées (Fig.III.7 (b) et (c)). En effet, le champ améliore le confinement des positons pour des sources de faibles rayons. Par conséquent, cette étude montre que malgré la diminution attendue du volume de détection de la sonde, la β-MicroProbe reste suffisamment sensible et adaptée à la mesure quantitative de l'accumulation locale de traceurs dans les structures cérébrales. D'autre part, selon la région d'implantation, les positons peuvent être confinés dans une plus grande proportion dans la structure d'intérêt, notamment pour les isotopes les plus énergétiques comme le ^{11}C ou l'^{15}O.

Sur la base de ces résultats préliminaires encourageants, nous allons maintenant nous centrer sur l'influence d'un champ magnétique de 7-T sur les différents paramètres de la sonde. En effet, pour acquérir des images IRM anatomiques de plus en plus résolues chez le petit animal, les aimants tendent vers des champs plus intenses (§ I. 3. 2), 7-T étant le plus haut champ dédié aux études *in vivo* chez le petit animal exploité en France actuellement. A cette intensité, nous venons de voir que l'effet du champ devenait significatif. Ainsi, après une quantification de l'influence du champ magnétique de 7-T sur le volume de détection de la sonde, la sensibilité de détection et le rendement lumineux de la sonde seront théoriquement et expérimentalement déterminés sans et avec champ magnétique. Dans chaque cas, nous considérerons que la sonde est perpendiculaire au champ magnétique durant tout le temps de l'acquisition comme c'est le cas lors d'études cérébrales, l'animal étant anesthésié.

II Détermination du Volume de Détection de la sonde par simulation à 7 Tesla

La radioactivité β issue des molécules radiomarquées, qui va être détectée par la sonde, est incluse dans un Volume de détection (VD) au-delà duquel aucun positon ne sera détecté (Chap.II §I. 1). Cette information, qui ne peut être évaluée simplement expérimentalement, est un paramètre essentiel caractérisant la sonde. En effet, la connaissance du VD nous renseigne sur l'étendue de la (des) zone(s) cérébrale(s) d'où provient le signal. Le VD ainsi que l'efficacité de détection locale correspondant à celui-ci sont des éléments fondamentaux pour la quantification du signal radioactif, quantification qui sera détaillée dans le chapitre suivant. Dans cette partie, nous allons donc déterminer par simulation le VD et l'efficacité locale de détection ε dans un champ magnétique de 7-T.

II. 1 Influence du champ magnétique de 7-T sur le VD

Dans un premier temps, nous avons simulé une fibre de 500µm de diamètre placée dans une source cylindrique homogène de ^{18}F, ^{11}C et ^{15}O dans des tissus cérébraux. Les positons sont émis jusqu'à une distance minimum de 1.25, 2.75 et 4.75 mm de la sonde. Ces valeurs ont été déterminées sur la base des données obtenues précédemment (Fig.III.7) et correspondent au rayon au-delà duquel les positons ne contribuent plus à l'activité détectée. Ainsi, on limite le temps de calcul tout en prenant en compte les positons contribuant au signal. Cette simulation nous permet d'obtenir les coordonnées d'émission des positons et l'interaction ou non de ces particules avec la sonde.

Dans un second temps, à partir des informations délivrées par la simulation, l'analyse des données a été réalisée sous Matlab6.5 dans le but d'analyser et de visualiser le VD. A cette fin, une matrice 3-D a été générée et symbolise l'espace des coordonnés dans lequel une particule peut-être émise et détectée par la sonde. Chaque élément de la matrice représente un voxel de 100 µm de côté, dont la valeur correspond au rapport entre le nombre de particules détectées par la sonde sur le nombre de particules émises pour ce voxel, c'est-à-dire à l'efficacité locale de détection ε.

La figure III. 8 présente l'exemple du VD, déterminé pour une fibre placée dans une source de ^{11}C sans champ magnétique et avec un champ magnétique de 7-T, vu selon 2 axes. On peut clairement voir la réduction du VD dans les directions perpendiculaires à l'axe d'application du champ.

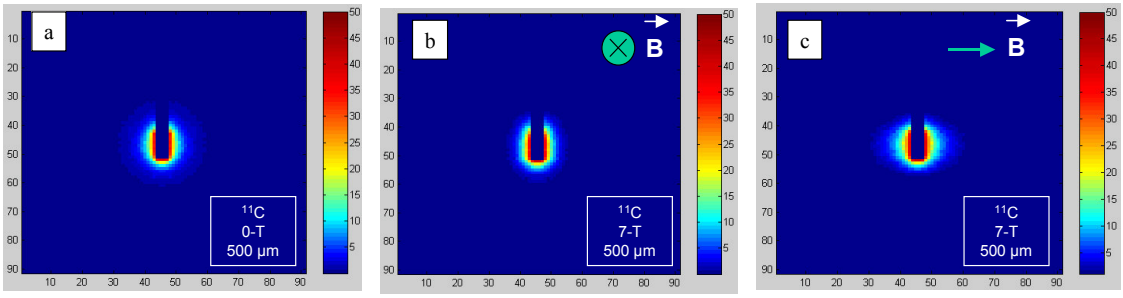


Figure III. 8 : *Volume de Détection pour une fibre de 0.5 mm de diamètre et 1.0 mm de scintillateur plongé dans du ^{11}C en l'absence de champ magnétique (a), sous un champ magnétique de 7-T orienté dans le sens perpendiculaire au plan de la feuille (b) et parallèlement au plan de la feuille (c).*

II. 2 Quantification du VD et VD_{90} à 7-T

Pour quantifier le VD et le VD_{90}, définis au paragraphe I. 3 du chapitre II, nous avons choisi d'approximer $\varepsilon(\vec{r})$ par une fonction $\varepsilon^*(\vec{r})$ ayant une symétrie ellipsoïdale triaxiale. Nous avons calculé les distances (a, b, c) maximum d'où un positon pouvait atteindre la sonde selon les 3 axes définis sur la figure III.5. $\Omega(u_K)$ est alors le volume ellipsoïdale avec les axes ($a*u_K$, $b*u_K$, $c*u_K$). Dans notre approximation, $\Omega(1)$ correspond visiblement au VD et VD_{90} est le volume ellipsoïdale $\Omega(u_K)$ avec u_K défini selon l'équation 5. Les VD et VD_{90} ainsi calculés pour les différents isotopes et champs sont présentés en µl dans le tableau III.5.

$$\frac{\int_{\Omega(u_K)} \varepsilon^*(\vec{r})\,d\vec{r}}{\int_{\Omega(1)} \varepsilon^*(\vec{r})\,d\vec{r}} = 0.90 \qquad \text{(III.5)}$$

	^{18}F		^{11}C		^{15}O	
	0-T	**7-T**	**0-T**	**7-T**	**0-T**	**7-T**
VD	30.8	16.9	136.9	39.5	1046.6	142.8
VD_{90}	1.9	1.6	9.0	3.5	57.6	10.4

Tableau III.5 : *VD et VD_{90} pour une fibre de 0.5 mm de diamètre et 1.0 mm de scintillateur pour du ^{18}F, du ^{11}C et de l'^{15}O déterminé par simulation (en µl).*

Au regard des expériences biologiques, le volume contribuant concrètement au signal est bien plus faible que le VD. En effet, pour le ^{18}F et le ^{11}C par exemple en l'absence de champ magnétique, 99% du signal est enregistré dans 17 µl et 46.3 µl respectivement autour de la sonde. Donnons nous comme référence les volumes de certaines structures cérébrales comme le cervelet, ~237 µl, le striatum, ~90 µl ou l'hippocampe, ~108 µl, qui sont parmi les plus grosses structures du cerveau. Ainsi, selon la région étudiée et l'isotope utilisé, le VD sera totalement ou partiellement inclus dans la structure. On peut noter par exemple que les volumes de détection du ^{18}F et du ^{11}C seront complètement compris dans le cervelet. Tandis que pour les structures complexes ou de petites dimensions, selon l'endroit d'implantation de la sonde, le VD ne sera pas totalement inclus.

Lorsque l'on applique le champ magnétique, le VD et le VD_{90} sont fortement réduits notamment pour les isotopes les plus énergétiques comme l'^{15}O dont le VD_{90} est réduit d'un facteur 5.5. La figure III.9(a-b) montre les résultats de notre simulation pour ce dernier isotope. L'échelle de gris varie d'une efficacité locale de détection ε faible (noir) à une efficacité locale de détection ε maximale (blanc). Les profils d'efficacité locale pour l'^{15}O selon les différents axes passant par le centre de la fibre scintillante ont été déterminés et représentés sur la figure III.9(c) sur l'un des axes perpendiculaire au champ. Comme attendu, lorsque l'on s'éloigne de la sonde, l'efficacité locale diminue fortement à cause des effets d'angle solide et le ralentissement progressif des particules dans les tissus. Nous avons vérifié que lorsque l'on appliquait le champ de 7-T, aucun changement dans le profil d'efficacité n'était perceptible dans la direction parallèle au champ. Comme supposé, on peut voir que dans les directions perpendiculaires au champ, les différences les plus importantes qui peuvent être observées entre 0-T et 7-T se trouve près de la fibre et loin de la fibre. En effet, l'efficacité locale est plus forte avec un champ magnétique proche de la fibre tandis que lorsque l'on s'éloigne du centre de la fibre, l'efficacité locale est plus forte sans champ. Comme mentionné précédemment, en raison du rayon de courbure des particules chargées sous l'action du champ magnétique, les positons les plus éloignés ne sont plus détectés par la sonde tandis que le confinement des positons les plus proches améliore l'efficacité locale de détection.

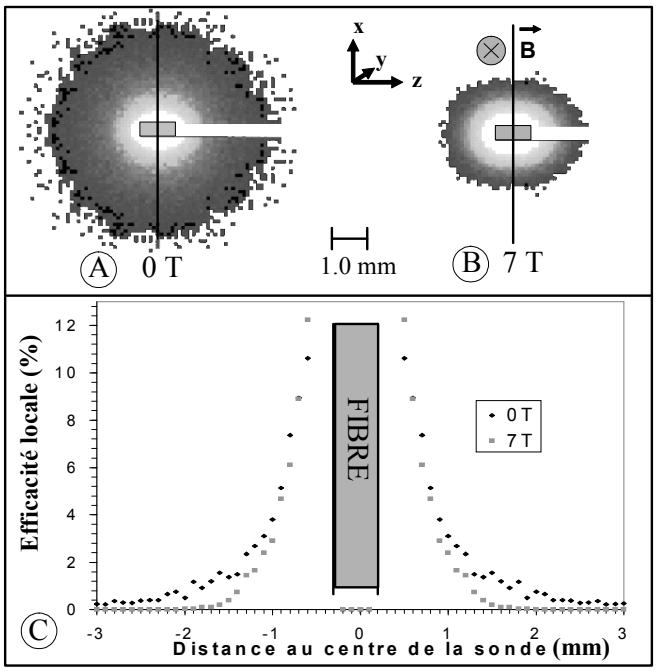


Figure III.9 : *Volume de détection pour une fibre de 0.5 mm de diamètre plongée dans de l'^{15}O. (a) VD de la sonde sans champ magnétique. (b) VD de la sonde avec un champ magnétique de 7-T. (c) Profil de l'efficacité locale de détection ε dans l'axe perpendiculaire à la fibre.*

III Détermination de la sensibilité de détection de la sonde

Dans la continuité des études menées sur l'effet d'un champ magnétique intense sur les paramètres caractérisant la sonde, nous avons évalué théoriquement et expérimentalement la sensibilité de détection de la sonde avec et sans champ. Les résultats présentés au §I. 3. 3 ont permis de poser les premiers jalons montrant que, bien que le VD à 7-T puisse être fortement réduit pour une sonde de 500 µm, le rapport d'activité détectée avec et sans champ n'était que faiblement diminué démontrant la possibilité théorique d'utiliser la sonde dans un aimant haut champ. Dans ce paragraphe, nous allons présenter dans une première étape les sensibilités de détection obtenues par simulation pour différents diamètres de sondes et différents isotopes permettant d'analyser et quantifier l'effet physique engendré par le champ. Dans une seconde étape, nous exposerons les expériences réalisées auprès de l'IRM 7-T de la plateforme Animage (Lyon) pour déterminer la sensibilité de détection expérimentale.

III. 1 Sensibilité de détection obtenue par simulation

Dans ce cadre, nous avons simulé toujours selon le même principe une sonde de 0.5 mm, 1.0 mm et 1.5 mm de diamètre dans une source cylindrique d'une solution de ^{18}F, ^{11}C et ^{15}O placée successivement dans un champ de 0-T et 7-T. Le tableau III.6 indique les sensibilités de détection géométriques en cps/(kBq/mL), définis équation II.3, et le rapport avec et sans champ magnétique de ces sensibilités. On peut noter que la sensibilité déterminée

ici par simulation est uniquement liée à l'aspect d'angle solide et ne prend notamment pas en compte les pertes optiques par fusion ou liées aux interfaces optiques et plus généralement l'efficacité de détection propre au détecteur. Comme attendu, la sensibilité augmente avec le diamètre de la sonde et avec l'énergie de l'isotope considérée. L'application du champ de 7-T entraîne une perte d'efficacité, également dépendante des isotopes et du diamètre des sondes utilisées ; plus le diamètre de la sonde et l'énergie de l'isotope sont grands, plus le rapport est faible. Cette diminution atteint 18% pour une sonde de 1.5 mm de diamètre dans un bêcher d'^{15}O, soulignant le fait que pour les gros diamètres de sondes dans un haut champ magnétique, les performances de la sonde sont altérées. Ceci représente un cas extrême qui en pratique ne sera pas rencontré lors d'expériences biologiques. En effet, pour une sonde de 500 µm de diamètre, diamètre le plus couramment utilisé dans un contexte biologique, la perte en sensibilité est faible (le rapport reste supérieur à 92%). Ceci ne représente donc pas un obstacle aux expériences de radiomarquage chez le petit animal. L'effet de la baisse de sensibilité géométrique observé ici est la conséquence de la réduction du VD lorsque le champ magnétique intense rentre en jeu comme évoqué précédemment.

	^{18}F			**^{11}C**			**^{15}O**		
	∅ 0.5 mm	**∅ 1.0 mm**	**∅ 1.5 mm**	**∅ 0.5 mm**	**∅ 1.0 mm**	**∅ 1.5 mm**	**∅ 0.5 mm**	**∅ 1.0 mm**	**∅ 1.5 mm**
0-T	0.23 ($<10^{-2}$)	0.44 ($<10^{-2}$)	0.69 ($<10^{-2}$)	0.52 (0.01)	0.98 (0.01)	1.57 (0.02)	1.25 (0.03)	2.62 (0.05)	4.34 (0.06)
7-T	0.22 ($<10^{-2}$)	0.40 ($<10^{-2}$)	0.60 ($<10^{-2}$)	0.47 ($<10^{-2}$)	0.87 (0.01)	1.34 (0.02)	1.18 (0.03)	2.26 (0.05)	3.62 (0.06)
Rapport 7-T/0-T	0.96 ($<10^{-2}$)	0.91 ($<10^{-2}$)	0.87 ($<10^{-2}$)	0.95 (0.02)	0.89 (0.01)	0.85 (0.01)	0.94 (0.02)	0.86 (0.02)	0.83 (0.01)

Tableau III.6 : *Sensibilité pour une fibre scintillante de 1.0 mm de longueur et de 0.5, 1.0 et 1.5 mm de diamètre plongée dans du ^{18}F, du ^{11}C et de l'^{15}O et le rapport sensibilité avec champ magnétique sur sensibilité sans champ déterminé par simulation et normalisé en cps/(kBq/mL).*

III. 2 Sensibilité de détection expérimentale

Les résultats théoriques établissant la faisabilité d'acquérir des cinétiques de traceurs sous champ magnétique intense, nous avons entrepris de comparer ces données simulées avec les résultats expérimentaux. Dans ce but, nous avons adapté les interfaces optiques pour que celles-ci soient en matériaux amagnétiques (Delrin®) et utilisé un guide optique de 8 m afin de garder l'électronique loin de l'IRM, au delà de la barrière des 5 Gauss (Fig. III.10).

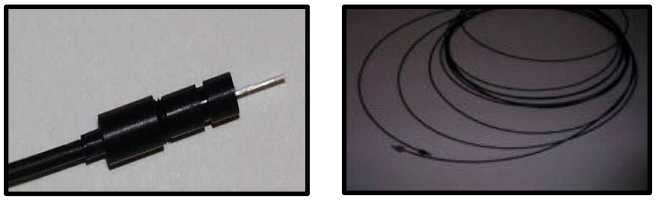


Figure III.10 : *Images des sondes et guides adaptés pour les expériences sous IRM.*

Dans une première étape, nous avons testé l'influence d'un champ magnétique intense sur l'électronique de la β-MicroProbe. En effet, la modification des trajectoires électroniques sous l'influence du champ magnétique peut conduire à une diminution des efficacités de collection entre les électrodes du tube. Notre photomultiplicateur (Hamamatsu R7400P) est relativement insensible aux champs magnétiques élevés du fait de ses dimensions qui limitent la distance de propagation des électrons de quelques millimètres. Ce PM est donné par le constructeur comme supportant jusqu'à 50 mT sans diminution de son gain. Dans le but de vérifier ces informations, les études sur les variations de bruit et de gain ont tout d'abord été menées sur un IRM de type VARIAN, équipé d'un aimant vertical de 9.4 Tesla (ouverture 94 mm) à l'Institut Curie Laboratoire Raymond Latarjet (Orsay) dans l'équipe ″Imageries et Spectroscopies Biomédicales Expérimentales par Résonance Magnétique″. Pour cela, différents béchers rendus amagnétiques et opaques à la lumière ont été conçus. Un des béchers, contenant la sonde, est alors placé au centre de l'aimant. Nous avons pu vérifier qu'aucun changement dans le bruit de fond du PM et dans le gain n'avait été détecté.

Puis, nous avons confirmé et conclu ce point en travaillant auprès de l'IRM 7-T de la plateforme Animage de Lyon (Fig III.11) avec le système β-MicroProbe commercial. Dans ce cas, nous avons placé le PM à chaque fois perpendiculairement et parallèlement aux lignes de champ magnétique. Aucune fluctuation significative du signal ou du bruit de fond du PM n'est apparue.

Figure III.11 : *Droite : image du μIRM de 7-T d'Animage – Gauche : mise en place du bécher amagnétique au centre de l'aimant.*

Dans un second temps, profitant des différents isotopes TEP fournis par le CERMEP, nous avons effectué des mesures d'activité avec la β-MicroProbe auprès de l'IRM 7-T. Dans ce cadre, les sensibilités de détection expérimentales ont été évaluées selon le protocole suivant:

-- Le bécher amagnétique et de taille adapté au VD des divers isotopes est rempli à la radiochimie avec 16 μl d'une des solutions radioactives, allant jusqu'à 10 mCi pour la solution d'^{15}O eu égard à sa très courte période (2 min).

-- La sonde choisie est vissée au bécher ainsi que le guide de 8 m.

-- Le bécher est ensuite placé soit au centre de l'aimant, où le champ est à 7-T, soit au delà de la barrière des 5 Gauss.

-- La β-MicroProbe est mise sous tension une fois le système stabilisé pour l'une ou l'autre des mesures.

-- Chaque donnée de temps est enregistrée pour que les mesures puissent être corrigées du bruit, de la décroissance radioactive et normalisées en cps/(kBq/mL).

-- Le rapport R de la sensibilité à 7-T, S_{7T}, et de la sensibilité à 0-T, S_{0T}, est enfin calculé avec une incertitude relative dépendant de l'écart-type à 7-T, σ_{7T}, et à 0-T, σ_{0T}, selon la formule (III.6).

$$\sigma_R = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{7T}}{S_{7T}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{0T}}{S_{0T}}\right)^2} * R \qquad \text{(III.6)}$$

Le tableau III.7 synthétise les résultats obtenus pour chaque isotope et chaque diamètre de sondes, pour lesquels la longueur de scintillateur est de 1 mm pour rendre possible la comparaison avec les simulations. Les erreurs relatives sont données entre parenthèses.

	^{18}F		^{11}C		^{15}O	
	∅ 0.5 mm	**∅ 1.0 mm**	**∅ 0.5 mm**	**∅ 1.0 mm**	**∅ 0.5 mm**	**∅ 1.0 mm**
0-T	0.18 ($<10^{-2}$)	0.44 ($<10^{-2}$)	0.28 (0.01)	0.74 (0.01)	0.82 (0.01)	1.95 (0.02)
7-T	0.17 ($<10^{-2}$)	0.41 ($<10^{-2}$)	0.28 (0.01)	0.72 (0.01)	0.80 (0.01)	1.86 (0.02)
Rapport 7-T / 0-T	0.94 (0.02)	0.94 (0.01)	0.98 (0.04)	0.97 (0.02)	0.98 (0.02)	0.95 (0.01)

Figure III.7 : *Sensibilité pour une fibre scintillante de 1.0 mm de longueur et de 0.5 et 1.0 de diamètre plongée dans une source homogène de ^{18}F, du ^{11}C et de l'^{15}O et rapport de sensibilité avec et sans champ magnétique déterminé expérimentalement et normalisé en cps/(kBq/mL).*

Tout d'abord, nous pouvons mentionner que les sensibilités de détection expérimentales sont globalement plus faibles que les sensibilités théoriques. Ceci est principalement du au fait que les simulations ne prennent pas en compte des pertes propres à la chaîne de détection (pertes optiques, seuil en énergie en sortie de PM). Considérant les rapports de ces sensibilités, on observe une même tendance à décroître en présence du champ magnétique comme cela a été entrevu par les simulations. Néanmoins, il peut être noté que la plupart de ces valeurs sont légèrement supérieures à celles obtenues par simulation Monte Carlo. L'étude du troisième paramètre caractérisant la sonde, à savoir le rendement lumineux, va permettre d'éclaircir ce dernier aspect.

IV Rendement lumineux sans et avec champ magnétique

Le rendement lumineux est défini comme le nombre de photons résultants de l'interaction entre le positon et le scintillateur et vu en bout de chaîne par le PM. Il dépend du dépôt d'énergie de la particule incidente dans le scintillateur, mais aussi des pertes optiques liées à l'angle de capture dans la fibre puis au guide optique et ses points de connexion. Nous allons dans ce qui suit analyser le comportement de ce rendement d'un point de vue purement théorique, c'est-à-dire en tenant compte uniquement des interactions dans le scintillateur par simulation, puis d'un point de vue expérimental en reprenant toute la chaîne de détection.

IV. 1 Spectres de l'énergie déposée dans la sonde obtenus par simulation

Pour connaître plus précisément l'impact du champ magnétique sur le signal enregistré, nous avons déterminé dans un premier temps l'énergie déposée dans le

scintillateur pour trois isotopes et trois diamètres de fibres de 1.0 mm de longueur de scintillateur dans un champ de 0-T et 7-T. Les énergies moyennes et maximales correspondantes sont indiquées Tableau III.8 et III.9 respectivement. Le nombre maximum de photoélectrons est défini comme le nombre photoélectronique ayant une intensité correspondant à 1% de l'intensité maximale. On peut tout d'abord noter que, comme on pouvait le prévoir, l'énergie maximum et moyenne déposée augmente avec le diamètre de la fibre. Le résultat notable est une augmentation du dépôt maximum en énergie sous champ magnétique, jusqu'à 30% d'augmentation pour l'^{15}O pour une fibre de 1.0 et 1.5 mm de diamètre. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que globalement les positons soumis à la force de Lorentz tournent autour de l'axe du champ magnétique. Cela entraîne un parcours plus long dans la fibre scintillante. En conséquence, les positons déposent plus d'énergie entraînant une augmentation du rendement de lumière.

IV. 1 Spectres de l'énergie déposée dans la sonde obtenus par simulation

Pour connaître plus précisément l'impact du champ magnétique sur le signal enregistré, nous avons déterminé dans un premier temps l'énergie déposée dans le scintillateur pour trois isotopes et trois diamètres de fibres de 1.0 mm de longueur de scintillateur dans un champ de 0-T et 7-T. Les énergies moyennes et maximum correspondantes sont indiquées Tableau III.8 et III.9 respectivement. Le nombre maximum de photoélectrons est défini comme le nombre photoélectronique ayant une intensité correspondant à 1% de l'intensité maximale relative. On peut tout d'abord noter que, comme on pouvait le prévoir, l'énergie maximum et moyenne déposée augmente avec le diamètre de la fibre. Le résultat notable est une augmentation du dépôt maximum en énergie sous champ magnétique, jusqu'à 30% d'augmentation pour l'^{15}O pour une fibre de 1.0 et 1.5 mm de diamètre. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que globalement les positons soumis à la force de Lorentz tournent autour de l'axe du champ magnétique. Cela entraîne un parcours plus long dans la fibre scintillante. En conséquence, les positons déposent plus d'énergie entraînant une augmentation de la quantité de lumière produite.

La figure III.8 montre l'augmentation de l'énergie déposée sous champ pour une fibre de 1 mm de diamètre dans de l'^{15}O, isotope pour lequel l'effet est plus important. Pour cet isotope, deux aspects peuvent être remarqués. D'un côté, une décroissance du nombre de positons détectés sous champ magnétique peut être observée pour les énergies les plus probables. D'un autre côté, une augmentation de l'énergie déposée apparaît pour les évènements les plus énergétiques. Dans ce cas, on peut clairement observer que les deux courbes se croisent en raison de l'augmentation de la quantité de lumière produite sous 7-T.

Isotope	**Energie moyenne**					
	Ø 0.5 mm		**Ø 1.0 mm**		**Ø 1.5 mm**	
	0-T	**7-T**	**0-T**	**7-T**	**0-T**	**7-T**
^{18}F	130	133	167	163	179	172
^{11}C	128	137	182	188	212	211
^{15}O	114	125	180	202	223	250

Tableau III.8: *Comparaisons des énergies moyennes simulées (en keV) avec et sans champ magnétique pour des sondes de 0.5, 1.0 et 1.5 mm de diamètre et pour différents isotopes.*

Isotope	Energie maximale					
	Ø 0.5 mm		Ø 1.0 mm		Ø 1.5 mm	
	0-T	7-T	0-T	7-T	0-T	7-T
^{18}F	415	425	485	500	525	525
^{11}C	425	505	585	655	655	735
^{15}O	445	515	655	855	765	995

Tableau III.9: *Comparaisons des énergies maximales simulées (en keV) avec et sans champ magnétique pour des sondes de 0.5, 1.0 et 1.5 mm de diamètre et pour différents isotopes.*

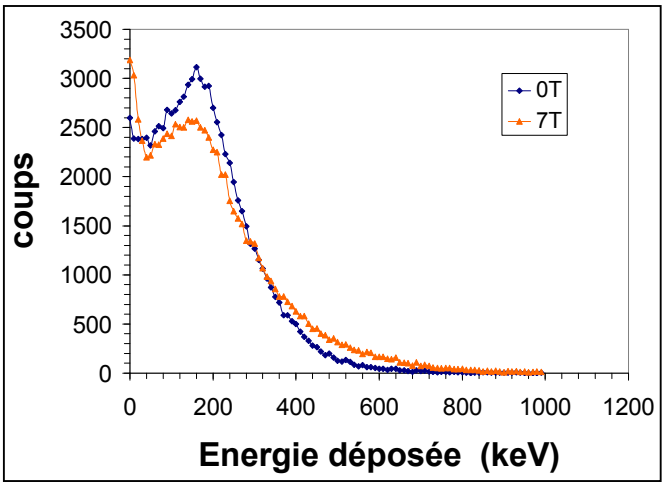


Figure III.12 : *Energie déposée simulée (en keV) pour une sonde de 1 mm de diamètre dans de l'^{15}O avec et sans champ magnétique (normalisée au même nombre de coups).*

Ces simulations nous ont permis de cibler nos choix quant aux mesures expérimentales à effectuer. En effet, disposant de créneaux IRM limités, les spectres simulés ont dirigé nos études préférentiellement sur des sondes de diamètre plus important et sur les isotopes les plus énergétiques, plus particulièrement sur l'^{15}O où l'effet est le plus net. Ceci afin de confirmer expérimentalement l'augmentation de la quantité de lumière produite sous champ.

IV. 2 Evaluation expérimentale des pertes optiques

Nous avons déjà vu que pour convertir le spectre en énergie déposée en distribution photoélectronique, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Tout d'abord, l'énergie déposée dans le cœur de la fibre scintillante est convertie en photons optiques avec un pic d'émission à 435 nm (cf chap. II §I.2.1): 8000 photons par MeV d'énergie déposée selon une distribution poissonnienne. Les photons optiques ne seront pas tous transmis jusqu'à la fenêtre de la photocathode. Une partie sera perdue par transmission optique (seul 5.6% au minimum des photons sont collectés), l'autre en raison de la fusion et de l'utilisation des guides. Ainsi, nous allons à présent décrire le dispositif expérimental réalisé pour déterminer les pertes générées par la fusion, le guide et les connecteurs.

IV. 2. 1 Dispositif expérimental

En raison de la faible intensité du signal optique obtenu après transmission dans la fibre scintillante, dans la fibre claire et au niveau de la fusion, les pertes optiques ont été évaluées à l'aide du dispositif expérimental présenté figure III. 14, permettant d'effectuer une analyse spectroscopique fine des faibles niveaux de lumière.

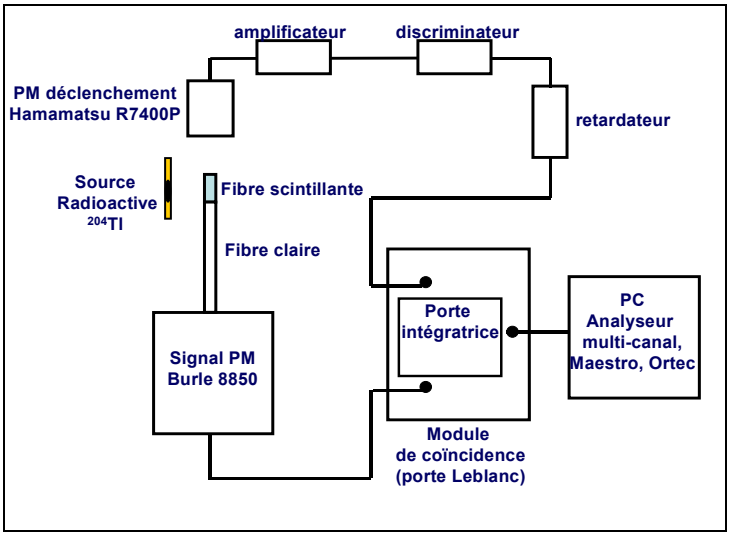


Figure III. 14 : *Schéma du dispositif expérimental en coïncidence permettant l'analyse spectroscopique de faibles signaux lumineux.*

Le principe de ce dispositif repose sur l'utilisation d'un photomultiplicateur (PM) Quantacon Burle 8850 (Burle Industries, Lancaster, Pennsylvania) [14]. Celui-ci est basé sur une photocathode bialkaline et est composé de 12 dynodes dont la première possède un gain particulièrement élevé. Ceci lui confère une résolution spectrale autorisant la discrimination d'au moins 5 photoélectrons. Cette haute résolution en énergie nous permet alors de calibrer directement l'intensité lumineuse en photoélectrons. De plus, son efficacité quantique est d'un peu plus de 20% à 435 nm, c'est-à-dire au pic d'émission de la fibre scintillante BCF-12. Ses principales caractéristiques sont résumées tableau III.10.

Référence	Gain	Nombre de dynodes	Bande spectrale	Bruit	Diamètre de la photocathode
Burle 8850	2.10^8 à 2400V 6.10^8 à 2600 V	12	260 à 630nm	~200 cps	51-mm

Tableau III.10 : *Principales caractéristiques du photomultiplicateur Quantacon Burle 8850.*

Différents diamètres (0.5 et 1.0 mm) de fibres scintillantes (Bicron, BCF-12) non fusionnées ainsi que de fibres scintillantes de 2.0 mm de longueur fusionnées à des fibres claires (Bicron, BCF-98) ont été irradiées avec une source de ^{204}Tl, émetteur β^-. Le ^{204}Tl a l'avantage de présenter un spectre en énergie assez similaire à celui du ^{18}F (Fig.III.1(d)) mais avec un temps de demi-vie beaucoup plus long ($T_{1/2}$ = 3.79 ans). Chaque fibre est placée au

centre du PM et à 5 mm de la source de façon reproductible grâce au support de pièces mécaniques adaptées aux différents diamètres des fibres utilisées (Fig. III.14).

Pour s'affranchir du bruit thermique du Burle, composante non négligeable du premier photoélectron, un circuit en coïncidence a été réalisé. Celui-ci a été développé à l'aide d'un second PM (R7400P, Hamamatsu) placé en bout de fibre scintillante et du côté opposé au Burle. Ainsi positionné, ce dernier récupère une partie importante de la lumière issue de l'interaction des particules et constitue en tant que tel un signal de déclenchement légitime pour valider la coïncidence. Le signal issu du Burle est alors délivré à une porte linéaire intégratrice (porte Leblanc) développée initialement dans notre laboratoire, qui intègre le signal présent pendant le temps d'ouverture (temps d'ouverture = 150 ns), déclenché par un signal externe. La porte intégratrice produit donc un signal amplifié linéaire des évènements issus du Burle lorsqu'un signal provenant du PM de "déclenchement" est détecté simultanément pendant l'ouverture de la fenêtre. Le signal linéaire est ensuite transmis à un analyseur multi-canal (Maestro, Ortec). Ce dispositif permet ainsi une mesure du signal de scintillation seul.

IV. 2. 2 Quantité de lumière obtenue pour des fibres non fusionnées

Basées sur le dispositif précédemment décrit, les quantités de lumière résultant de l'irradiation par la source de ^{204}Tl ont été déterminées pour différentes fibres non fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre. La figure III.15 présente les spectres obtenus, moyennés sur un échantillon de cinq fibres et calibrés en photoélectrons. Afin de comparer quantitativement ces spectres, le nombre moyen et le nombre maximum de photoélectrons sont indiqués dans le tableau III.11. Le nombre maximum de photoélectrons est défini comme le nombre photoélectronique ayant une intensité correspondant à 1% de l'intensité maximale.

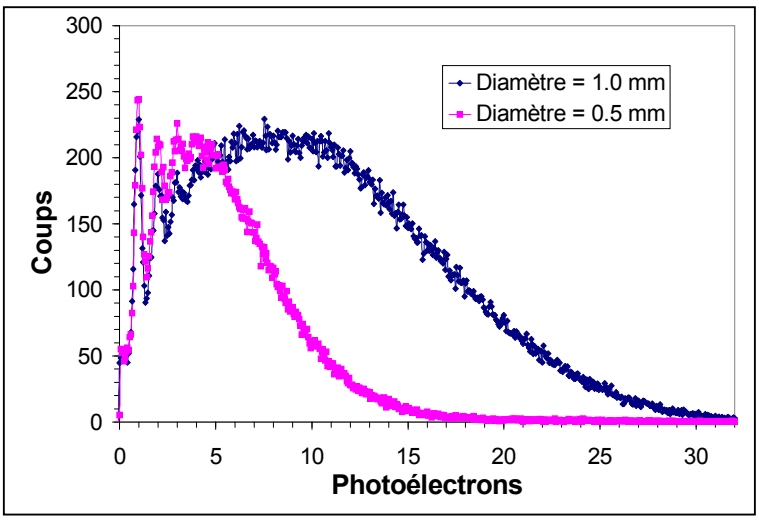


Figure III.15 : *Spectres photoélectroniques expérimentaux obtenus pour des fibres non fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre irradiées par une source de ^{204}Tl.*

	∅ 0.5 mm	∅ 1.0 mm
Nombre moyen de photoélectrons	5.50 ± 0.25	10.63 ± 0.23
Nombre maximum de photoélectrons	16.68 ± 1.01	29.64 ± 0.83

Tableau III.11 : *Nombre moyen et maximum de photoélectrons obtenus expérimentalement pour des fibres non fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre irradiées par une source de ^{204}Tl.*

Cette étude montre que la quantité de lumière générée par l'interaction d'un électron issu de la source de ^{204}Tl, ayant un spectre proche de celui du ^{18}F, n'excède pas 11 photoélectrons en moyenne et une trentaine au maximum pour une fibre de 1.0 mm de diamètre. Ces niveaux de lumière sont réduits de moitié si l'on considère des fibres de 0.5 mm de diamètre. Une analyse réalisée avec un PM adapté à la mesure de photons uniques est compatible avec les faibles niveaux lumineux rencontrés dans cette étude. Néanmoins, d'autres paramètres sont à prendre en compte comme la fusion des fibres ainsi que les guides optiques.

IV. 2. 3 Quantité de lumière obtenue pour des fibres fusionnées

Pour évaluer l'influence de la fusion sur le niveau de lumière généré, différentes fibres fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre et 2 mm de longueur ont été testées dans les mêmes conditions que celles citées précédemment. Les spectres obtenus sont présentés figure III.16 et les différents paramètres caractérisant ces spectres sont indiqués tableau III.12.

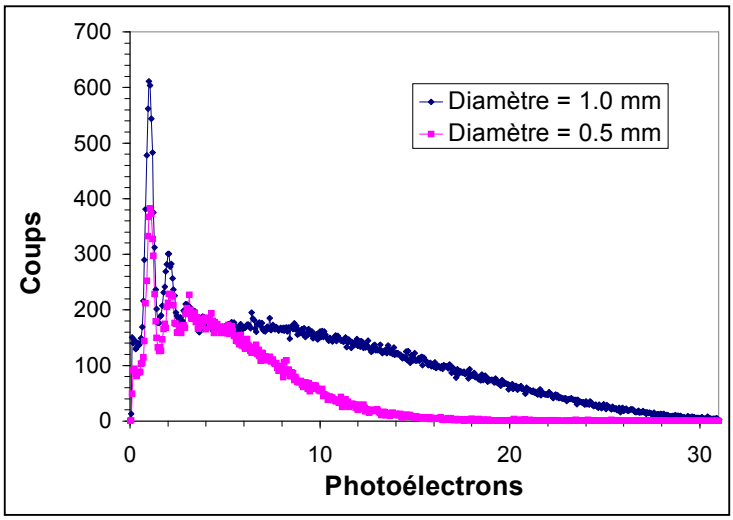


Figure III.16 : *Spectres photoélectroniques expérimentaux obtenus pour des fibres fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre et 2 mm de scintillateur irradiées par une source de ^{204}Tl.*

	∅ 0.5 mm	∅ 1.0 mm
Nombre moyen de photoélectrons	5.01 (± 0.38)	9.52 (± 0.46)
Nombre maximum de photoélectrons	14.96 (± 1.06)	28.52 (± 0.82)

Tableau III.12: *Nombre moyen et maximum de photoélectrons obtenus expérimentalement pour des fibres fusionnées de 0.5 et 1.0 mm de diamètre et 2 mm de scintillateur irradiées par une source de* ^{204}Tl.

Les résultats de cette caractérisation indiquent une baisse peu significative du nombre de photoélectrons induit par la fusion d'une fibre scintillante avec une fibre claire. Les pertes sont inférieures à 11% en ce qui concerne les deux diamètres considérés. Ces mesures confirment la qualité du processus de fusion qui assure une transmission efficace de la lumière entre la fibre scintillante et le guide de lumière.

IV. 2. 4 Quantité de lumière avec guides optiques et connectique associée

Pour quantifier les pertes liées aux guides optiques et aux connecteurs, nous avons adapté le dispositif expérimental précédemment présenté en utilisant un support ajusté au Burle auquel le guide peut être connecté. L'autre extrémité est connectée à une sonde de 500 µm ou 1 mm de diamètre placée perpendiculairement à la source. Ainsi, tout comme pour les fibres "nues", les particules β atteignent la sonde par le côté et sont donc sensible au diamètre de la sonde. Les expériences ont été réalisées avec des guides de 60 cm, les plus couramment utilisés dans les expériences biologiques, puis avec des guides de 8 m, longueur choisie dans notre cas. Le nombre moyen et maximum en photoélectrons ainsi que le nombre de coups détecté pour des sondes de 0.5 et 1.0 mm pour les deux types de guides sont répertoriés dans le tableau III. 13.

L'utilisation d'un guide de 60 cm entraîne une diminution d'un facteur 3.3 du nombre moyen de photoélectrons pour une sonde de 1.0 mm et d'un facteur 2.7 pour une sonde de 0.5 mm par rapport à une fibre fusionnée seule. Ces mesures montrent qu'une grande partie des pertes optiques sont liée aux interfaces sonde/guide et guide PM. La différence de perte entre les deux types de fibres peut être expliqué par le fait que le guide optique à un diamètre de 1 mm. En effet, plus de lumière sera recueillie pour une fibre de 0.5 mm de diamètre placée en vis à vis du guide de 1.0 mm de diamètre que pour une fibre de 1.0 mm. Pour un guide 8 m, on observe une perte d'un facteur 1.5 pour des sondes de 1.0 mm et 1.3 pour des sondes de 0.5 mm par rapport à un guide de 60 cm. Les pertes générées par le guide de 8 m par rapport au guide de 60 cm sont liées principalement à l'atténuation du signal dans le guide PMMA (atténuation de 0.15dB/m à 435 nm).

	∅ 0.5 mm		∅ 1.0 mm	
	Guide de 60 cm	Guide de 8 m	Guide de 60 cm	Guide de 8 m
Nombre moyen de photoélectrons	1.84 (± 0.02)	1.44 (± 0.02)	2.86 (± 0.04)	1.87 (± 0.03)
Nombre maximum de photoélectrons	5.02 (± 0.65)	4.37 (± 0.16)	9.14 (± 0.25)	6.04 (± 0.24)

Tableau III.13: *Nombre moyen et maximum de photoélectrons obtenus expérimentalement pour des sondes de 0.5 et 1.0 mm de diamètre avec des guides de 0.6 et 8 m irradiées par une source de* ^{204}Tl.

IV. 3 Spectre photoélectronique expérimental avec et sans champ magnétique

Après avoir déterminé par simulation le dépôt en énergie attendu et les pertes optiques générées, des mesures spectrales ont été réalisées expérimentalement au CERMEP-Animage de Lyon. Dans l'expectative d'un dépôt en énergie plus important pour les isotopes les plus énergétiques, nous avons ciblé notre étude sur le ^{11}C et l'^{15}O bien que ces isotopes ont une durée de vie relativement courte. Le dispositif expérimental de mesure de faibles taux de lumière en présence d'un champ magnétique intense sera tout d'abord brièvement exposé. Les résultats des différents spectres obtenus seront présentés et discutés dans un second temps.

IV. 3. 1 Dispositif expérimental

Dans le cas des mesures sous champ, le dispositif en coïncidence n'est pas réalisable puisque le PM de déclenchement ne pas être utilisé dans l'IRM. Le Burle, placé dans une boîte noire, est donc uniquement relié à la porte intégratrice (porte Leblanc) et à l'analyseur multicanal (Fig. III. 18). Le protocole expérimental est similaire à celui effectué pour la mesure de sensibilité sous champ (§ III. 2). Le bécher rempli d'une solution radioactive et connecté au Burle par l'intermédiaire du guide de 8 m est donc placé, soit au centre de l'aimant, soit au-delà de la barrière des 5 Gauss.

Figure III.18 : *Image du dispositif expérimental utilisé au CERMEP-Animage (Lyon) pour les acquisitions de spectres photoélectroniques hors champ et dans l'IRM 7-T.*

IV. 3. 2 Spectres photoélectroniques à 0-T et 7-T

Les spectres en photoélectrons obtenus selon le dispositif précédemment décrit sont à présent présentés pour différents isotopes. Les figures III. 19 à 21 présentent les spectres photoélectroniques pour une sonde de 1.0 mm de diamètre et 1.0 mm de scintillateur plongée dans du ^{18}F, ^{11}C et ^{15}O respectivement à 0-T et 7-T (les courbes étant normalisées au même nombre de coups). Les différences d'allure des courbes ne sont pas significatives pour les isotopes les moins énergétiques tandis que l'on peut nettement observer une augmentation du rendement lumineux pour l'^{15}O où les deux courbes à 0-T et 7-T se croisent. Ainsi pour les

hautes énergies, on peut noter une augmentation de la quantité de lumière produite de plus de 50% sous champ (7ème photoélectron).

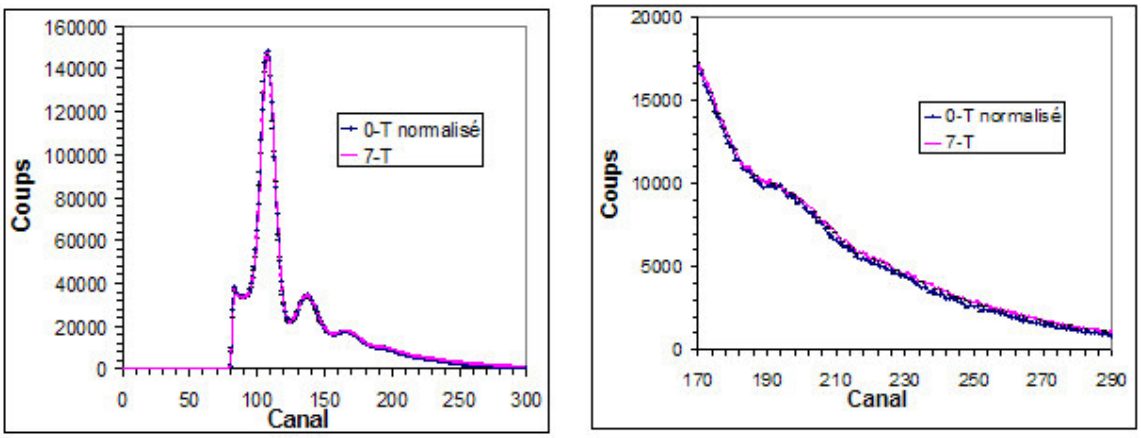


Figure III.19 *Droite : spectre photoélectronique expérimental pour une sonde de 1mm de diamètre-1mm de scintillateur plongé dans du ^{18}F -- Gauche : zoom sur le spectre photoélectronique du ^{18}F.*

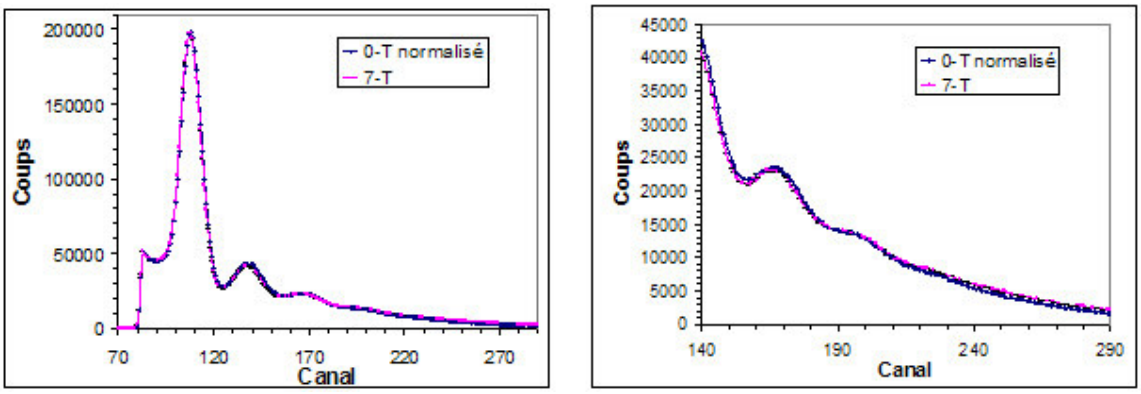


Figure III.20 *Droite : spectre photoélectronique expérimental pour une sonde de 1mm de diamètre-1mm de scintillateur plongé dans du ^{11}C -- Gauche : zoom sur le spectre photoélectronique du ^{11}C.*

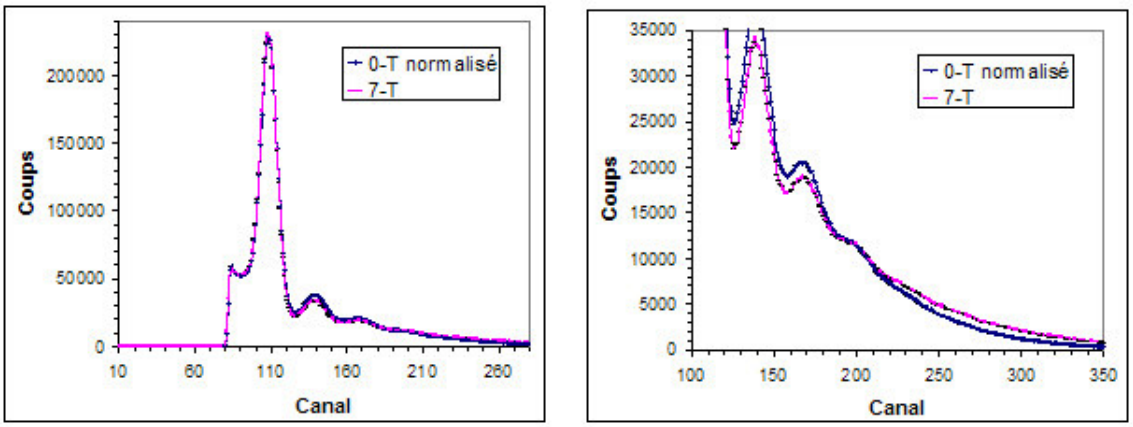


Figure III.21 *Droite : spectre photoélectronique expérimental pour une sonde de 1mm de diamètre-1mm de scintillateur plongé dans du ^{15}O -- Gauche : zoom sur le spectre photoélectronique du ^{15}O.*

Afin de comparer les spectres photoélectroniques sans champ magnétique et sous un champ de 7-T, le canal moyen C_{moy} des différents spectres et l'incertitude relative associée ΔC_{moy} ont été calculés respectivement selon les équations III.1 et III.2 suivantes :

$$C_{moy} = \frac{\sum_{i>94} n_i * i}{\sum_{i>94} n_i} \qquad \text{(équa. III.7)}$$

$$\Delta C_{moy} = \left(\frac{\sum_{i>94} \Delta n_i * i}{\sum_{i>94} n_i} \right) + \left(\frac{\sum_{i>94} \Delta n_i}{(\sum_{i>94} n_i)^2} * (\sum_{i>94} n_i * i) \right) \qquad \text{(équa. III.8)}$$

avec i le numéro de canal, n_i le nombre de coups au canal i et Δn_i l'écart type sur le nombre de coups détectés (avec $\Delta n_i = \sqrt{n_i}$). On remarquera que cette moyenne a été déterminée à partir du canal 95 pour ne pas prendre en compte le bruit électronique. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau III.14 ainsi que le nombre de photoélectrons moyens.

Isotope	Diamètre des sondes	Longueur du scintillateur	Canal moyen		Photoélectron moyen	
			0-T	7-T	0-T	7-T
^{18}F	1 mm	1 mm	134.81 ± 2.01	136.17 ± 2.00	1.89 ± 0.07	1.94 ± 0.07
^{11}C	500 µm	1 mm	117.42 ± 2.40	119.14 ± 2.98	1.31 ± 0.08	1.37 ± 0.10
	500 µm	2 mm	120.98 ± 8.72	123.61 ± 9.25	1.43 ± 0.29	1.52 ± 0.31
	1 mm	1 mm	137.12 ± 1.34	139.21 ± 1.84	1.97 ± 0.04	2.04 ± 0.06
^{15}O	500 µm	1mm	115.13 ± 12.30	118.53 ± 13.60	1.24 ± 0.41	1.35 ± 0.45
	1 mm	1 mm	133.79 ± 1.57	137.64 ± 1.89	1.86 ± 0.05	1.99 ± 0.06
	1.5 mm	1 mm	130.26 ± 2.02	134.50 ± 1.81	1.74 ± 0.07	1.88 ± 0.06

Tableau III.14: *Nombre moyen de photoélectrons obtenus expérimentalement pour différents diamètres de sondes plongées dans du ^{18}F, du ^{11}C et de l'^{15}O.*

Le résultat notable est une augmentation du rendement lumineux sous champ, ce qui confirment les études précédemment réalisées par simulation. Ce dernier point de l'étude, à savoir une augmentation de rendement lumineux sous champ magnétique, a été rapportée par de précédentes expériences, considérant des scintillateurs dans des champs magnétiques [15, 16]. Balalykin et al. ont trouvé une augmentation de l'énergie moyenne déposée et du rendement lumineux et émirent l'hypothèse que cette augmentation pouvait provenir de l'enroulement de la trajectoire des électrons autour du champ magnétique et entraîner dans le scintillateur les particules secondaires, qui se seraient "échappées" du détecteur sans champ.

V Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans ce chapitre a montré la possibilité d'utiliser la β-MicroProbe dans un champ magnétique intense et ainsi de proposer une alternative au couplage TEP/RMN, permettant d'acquérir simultanément des informations nucléaires et magnétiques. Globalement, le champ tend à décroître le VD de la sonde. Plus l'énergie des positons émis et plus le diamètre des sondes sont importants, plus l'impact d'un champ magnétique de 7-T est grand. Dans le cas d'études sur de petites structures, cette réduction est évidemment un atout puisque le VD est confiné dans la zone d'intérêt. De plus, bien que celui-ci puisse être fortement réduit, la sensibilité de détection géométrique n'est que faiblement diminué pour des diamètres de sondes et des isotopes couramment utilisés pour les expériences biologiques (jusqu'à 8% pour une sonde de 500 µm dans du ^{11}C). En effet, le champ magnétique améliore l'efficacité locale de détection pour les positons proches de la sonde, compensant partiellement la non-détection des positons loin de la sonde. Enfin, la différence de sensibilité expérimentale avec et sans champ reste très faible pour tous les diamètres de sondes et d'isotopes. Ainsi, deux effets se compensent. D'un côté, comme nous venons de le mentionner, nous avons déterminé une faible perte de la sensibilité géométrique. De l'autre côté, une augmentation de l'énergie déposée dans la fibre scintillante entraîne une augmentation du rendement lumineux.

Les résultats présentés ont démontré la faisabilité du couplage de la β-MicroProbe et des techniques RMN d'un point de vue physique. Sur cette base, nous avons investigué cette combinaison dans un contexte biologique qui fera l'objet du prochain chapitre. Dans ce but, nous avons choisi de reproduire des mesures pharmacologiques à l'aide du [^{18}F]-MPPF, un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}, les animaux anesthésiés étant placés durant l'acquisition dans l'IRM 7-T. L'objectif est double : (i) vérifier la stabilité du signal pharmacologique par rapport à celui obtenue hors champ simultanément aux acquisitions IRM; (ii) quantifier le signal radioactif à partir de la connaissance précise de l'implantation des sondes par IRMa, d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat et de la matrice d'efficacité locale simulée.

Références

[1] B. E. Hammer and N. L. Christensen. "Measurement of positron range in matter in strong magnetic fields" *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 42, pp. 1371-1376, 1995.

[2] R. R. Raylman, A. C. Clavo, S. C. Crawford, B. Recker, and R. L. Wahl. "Magnetically-enhanced radionuclide therapy (MERiT):in vitro evaluation" *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, vol. 37, pp. 1201-1206, 1997.

[3] www.physics.nist.gov/cgi-bin/Star/compos.pl.

[4] P. Cassette. "Programme de calcul du spectre en énergie des électrons émis par des radionucléides émetteurs bêta" *Note Technique LPRI/92/307/juillet (DRT/CEA, Saclay)*, 1992.

[5] Radionucléides. "Département des Applications et de la Métrologie des Rayonnements Ionisants" *Réédition Octobre*, 1991.

[6] S. Agostinelli. "Geant4-a simulation toolkit" *Nucl Ins and Meth in Phys Res A*, vol. 506, pp. 250-303, 2003.

[7] http://wwwasd.web.cern.ch/wwwasd/geant4/G4UsersDocuments/Overview/html/index.html.

[8] F. Pain. "Communication personnelle".

[9] J. Briefmeister, "MCNP - A general Monte Carlo N Particle Transport Code, Version 4C," Los Alamos National Laboratory LA-13709 M 2000.

[10] http://www.physics.nist.gov/cgi-bin/Star/compos.pl?matno=123.

[11] S. Derenzo, "Precision Measurement of annihilation point spread distribution for medically important positron emitters," presented at 5th int Conf Positron Annihilation, Japan, 1979.

[12] C. S. Levin and E. J. Hoffman. "Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution" *Phys Med Biol*, vol. 44, pp. 781-799, 1999.

[13] A. Desbrée, F. Pain, H. Gurden, L. Zimmer, L. Pinot, P. Laniece, and R. Mastrippolito. "Combining the radiosensititve Beta MicroProbe to Nuclear Magnetic Resonance: theoretical approach for in vivo studies in small animals" *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 140, pp. 47-52, 2004.

[14] www.burle.com/cgi-bin/byteserver.pl/pdf/8850.pdf.

[15] N. I. Balalykin, I. A. Golutvin, O. I. Kochetov, V. D. Kuznetsov, V. K. Makoveev, G. V. Myshinski, A. F. Novgorodov, V. G. Shabratov, A. G. Volodko, V. S. Klimenko, and A. S. Kurilin. "Measurement of the plastic scintillator response in the magnetic field" *Nucl Ins and Meth in Phys Res A*, vol. 390, pp. 286-292, 1997.

[16] M. Bertoldi, D. R. Green, V. Hagopian, J. Marraffino, A. Ronzhin, and J. Thomaston. "Scintillators in magnetic fields up to 20 T" *Nucl Ins and Meth in Phys Res A*, vol. 386, pp. 301-306, 1997.

Chapitre IV

Couplage de la β-MicroProbe et de la Résonance Magnétique Nucléaire : aspects biologiques

Le chapitre précédent nous a montré la faisabilité physique du couplage. Nous allons nous intéresser dans ce chapitre IV à la faisabilité de la combinaison des techniques magnétiques et de la β-MicroProbe dans un contexte biologique. La validation neurobiologique de ce couplage est basée sur la mesure pharmacocinétique d'un traceur sérotoninergique des récepteurs 5-HT_{1A}, le [^{18}F]-MPPF, simultanément à une acquisition par IRMa chez le rat anesthésié. Cette étude est réalisée en collaboration avec la plateforme Animage de Lyon, qui dispose d'un IRM 7-T dédié au petit animal, et le CERMEP où l'équipe de L. Zimmer travaille sur les mécanismes de dépression et l'effet thérapeutique des antidépresseurs pour lesquels les récepteurs 5-HT_{1A} jouent un rôle central.

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont impliqués dans des processus physiologiques tels que le sommeil, le comportement sexuel, l'apprentissage ainsi que dans divers désordres neuropsychatriques comme l'anxiété, la dépression ou encore la schizophrénie. S'appuyant sur de précédentes études réalisées sur la pharmacocinétique du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe [1-3], qui présente une densité importante en récepteurs 5-HT_{1A}, le protocole a été adapté pour les besoins des mesures sous champ, notamment par l'implantation de façon chronique, de deux sondes placées respectivement dans l'hippocampe (structure exprimant les récepteurs 5-HT_{1A}) et dans le cervelet (structure dépourvue en récepteurs).

Le premier objectif de ces expériences est de vérifier à la fois la stabilité du signal pharmacologique sous aimant en la comparant avec celles des enregistrements témoins obtenus hors champ et de réaliser simultanément une image par IRMa afin de déterminer le positionnement précis des 2 sondes. L'hippocampe et le cervelet sont pour cela des structures de choix puisqu'elles présentent un excellent contraste sous IRMa.

Le second objectif est de quantifier *in vivo* les concentrations en molécules radiomarquées dans l'hippocampe. En effet, le signal mesuré par la sonde est dans notre cas composé non seulement du signal issu du [^{18}F]-MPPF présent dans la zone cérébrale d'intérêt (l'hippocampe) mais également du signal issu de zones adjacentes qui appartiennent néanmoins au volume de détection. C'est pourquoi nous avons développé un ensemble de méthodologies basé sur la réalisation d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat. Ainsi, à partir de ce fantôme voxelisé et de la connaissance précise des coordonnées stéréotaxiques d'implantation grâce à l'IRMa, nous pourrons quantifier le signal radioactif détecté par la sonde *in vivo*.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps le système sérotoninergique et les récepteurs 5-HT_{1A} en particulier et leurs implications dans les mécanismes de dépression. Dans un second temps, nous résumerons les données obtenues précédemment sur les mesures du [^{18}F]-MPPF *in vivo* par l'utilisation de la β-MicroProbe. Nous détaillerons les premiers résultats obtenus pour valider le couplage β-MicroProbe/IRMa dans un contexte biologique et les méthodologies originales mises en œuvre (telle le fantôme voxelisé de cerveau) pour quantifier les mesures radioactives réalisées à l'aide de la sonde.

I Etude du système sérotoninergique

Un des systèmes de neurotransmission mis en cause dans l'étiologie de la dépression nerveuse est le système sérotoninergique: le développement de la plupart des antidépresseurs conventionnels est basé sur l'hypothèse que la dépression s'accompagne d'une diminution de la neurotransmission sérotoninergique cérébrale [4]. Actuellement, la classe pharmaceutique la plus utilisée en traitement clinique est celle des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS), dont la molécule-type est la fluoxétine (Prozac®). Cette classe d'antidépresseur permet d'augmenter puis d'équilibrer les quantités de sérotonine libérée dans le cerveau. Elle possède une efficacité thérapeutique chez la majorité des patients dépressifs mais les psychiatres constatent systématiquement un délai de 2 à 3 semaines avant qu'il n'y ait une réponse clinique effective. Les causes neurochimiques de ce délai d'action ne sont pas encore élucidées mais impliqueraient l'état d'activation des récepteurs 5-HT_{1A} [5]. Au moyen de la sonde β-MicroProbe, l'équipe de L. Zimmer (CERMEP, Lyon) s'est attachée à la compréhension de ce phénomène en étudiant la mesure de la fixation du [^{18}F]-MPPF, un traceur spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}, sur des modèles petits animaux.

C'est dans ce contexte et sur la base des résultats physiques obtenus précédemment que nous avons entrepris la validation biologique du couplage de la β-MicroProbe et des techniques magnétiques dans le cadre d'études pharmacocinétiques *in vivo* du système de neurotransmission sérotoninergique.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord décrire le système sérotoninergique avant de nous centrer plus particulièrement sur les récepteurs 5-HT_{1A}. Puis, après avoir fait un point sur la synthèse et la validation du [^{18}F]-MPPF, nous présenterons les études pharmacologiques réalisées avec ce traceur à l'aide de la β-MicroProbe.

I. 1 Le point sur le système sérotoninergique

Le cerveau est un organe complexe formé de nombreuses cellules qui communiquent entre elles afin de détecter et d'intégrer les informations endogènes au corps (température, pression artérielle, état hormonal…) et les informations de l'environnement (température, présence de danger, …) et de produire en réponse des comportements adaptés (réponses motrices, émotionnelles…). Les cellules cérébrales sont constituées de deux classes, elles-mêmes subdivisées en plusieurs catégories anatomofonctionnelles : les neurones, qui permettent la transmission de l'information dans les réseaux cérébraux et les cellules gliales, qui modulent cette transmission, régulent l'apport énergétique et participent à la défense immunitaire.

Dans cette partie, nous nous attacherons à une brève description structurale et fonctionnelle des neurones et de leurs modes de communication grâce notamment aux neurotransmetteurs, avant de cibler plus particulièrement le système sérotoninergique.

I. 1. 1 Description générale sur l'organisation et le fonctionnement des neurones

Le neurone comprend trois parties principales : le corps cellulaire (ou soma), les dendrites et l'axone (Fig. IV.1). Le corps cellulaire contient le noyau, contenant les chromosomes et divers organites se trouvant à l'intérieur de la membrane et nécessaires principalement à la traduction de l'information génétique et à la production énergétique de la cellule. Les dendrites, qui constituent le pôle récepteur du neurone, naissent en grand nombre du soma et se terminent généralement en pointe effilée. Ils ont rarement plus de 2 mm de longueur. Enfin, le corps cellulaire engendre généralement un seul axone, qui est une structure hautement spécialisée dans la transmission de l'information dans le système nerveux. La longueur de celui-ci peut mesurer moins d'un millimètre et peut atteindre plus d'un mètre, selon le type de neurone.

Les axones se terminent par une arborescence dont chaque ramification donne naissance à une terminaison axonique ou bouton synaptique de par sa forme caractéristique. Le bouton terminal est le site où l'axone entre en contact avec d'autres neurones et leur transmet l'information. Les axones peuvent être extrêmement ramifiés dans leur partie terminale, et chaque branche forme un point de contact avec le neurone adjacent qui s'appelle la synapse. La synapse peut se trouver sur les dendrites ou le corps cellulaire du neurone adjacent. Elle présente deux faces distinctes qualifiées de présynaptique (les boutons) et de postsynaptique (les dendrites). Cette organisation structurale force la transmission de l'influx nerveux de la partie présynaptique vers la partie postsynaptique. L'espace d'une dizaine de nanomètres situé entre la membrane présynaptique et la membrane postsynaptique représente la fente ou espace synaptique. La transmission de l'information d'un neurone à l'autre au niveau de la synapse constitue une série d'opérations complexes déterminant la transmission synaptique.

La transmission de l'information nerveuse est de nature électro-chimique : électrique parce que ce sont des potentiels d'actions (différence de potentiel transmembranaire ou décharge) qui circulent sur le neurone ; chimique, parce que pour franchir l'espace synaptique, il est nécessaire au neurone présynaptique d'envoyer un messager biochimique, le neurotransmetteur, vers le neurone postsynaptique. Les deux modes de transmission sont interdépendants : le potentiel d'action peut déclencher une dépolarisation du bouton présynaptique pour faire libérer le neurotransmetteur, et les potentiels synaptiques enclenchés par la fixation du neurotransmetteur sur ces récepteurs postsynaptiques peuvent provoquer le potentiel d'action. Dans ce système, la clef est le neurotransmetteur stocké au niveau présynaptique, la serrure est son récepteur postsynaptique.

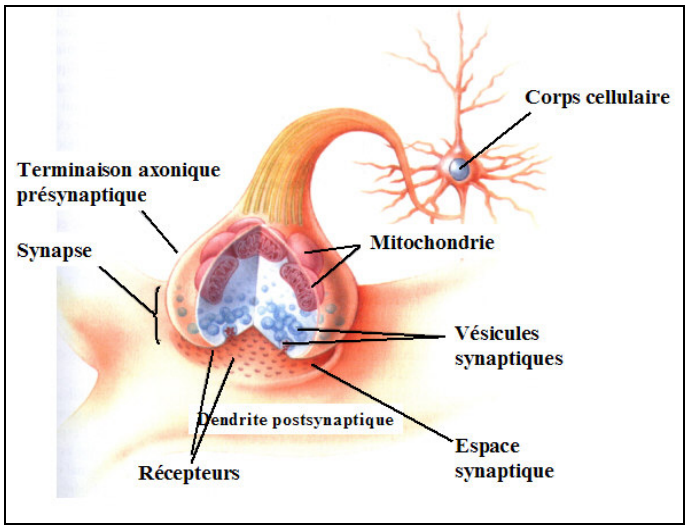


Figure IV.1 : *Schéma de l'organisation neuronale : terminaison axonique et synapse.*

I. 1. 2 Voies sérotoninergiques

La quasi-totalité des neurones sérotoninergiques, synthétisant la sérotonine, se trouve au niveau du tronc cérébral dans les noyaux raphés (Fig. IV.2). Ainsi, le système sérotoninergique est formé de 9 noyaux :

¤ Noyau raphé pallidus (B1)
¤ Noyau raphé obscurus (B2)
¤ Noyau raphé magnus (B3)
¤ Substance grise périventriculaire et area postrema (B4)
¤ Noyau raphé pontique (B5)
¤ Noyau raphé caudal (B6)
¤ Noyau raphé dorsal (B7)
¤ Noyau raphé médian (B8)
¤ Noyau raphé segmental réticulaire (B9).

Les neurones sérotoninergiques se projettent sur des cibles neuronales et non neuronales. Ainsi, les noyaux B1, B2 et B3 contiennent des neurones dont les axones se terminent surtout dans la moelle épinière. Les noyaux B6, B7, B8 et B9 forment le système ascendant dont les projections empruntent deux voies distinctes :

- le faisceau dorsal qui contient surtout des fibres originaires du raphé dorsal (B6, B7) qui innervent les colliculus supérieurs, les colliculus inférieurs et le striatum.
- Le faisceau dorsal qui a des projections vers le système limbique impliqué dans les émotions (cerveau dit ″affectif″) c'est-à-dire le septum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et les noyaux amygdaliens. Toutes les couches du cortex cérébral sont innervées par des axones sérotoninergiques provenant principalement du noyau raphé dorsal, B7.

Les autres noyaux raphé se projettent sur des structures du tronc cérébral et du cervelet.

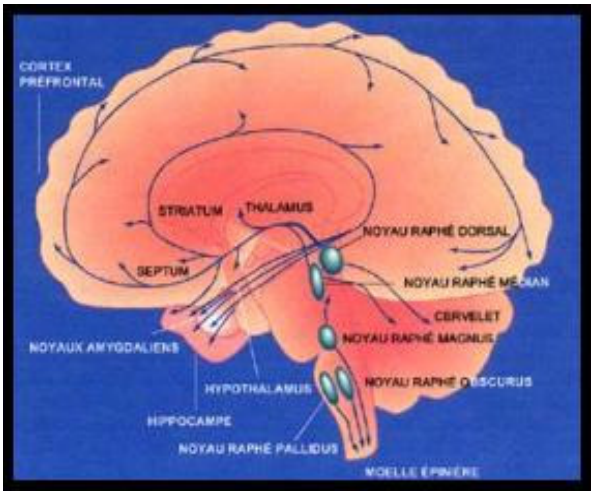


Figure IV.2 : *Schéma du système sérotoninergique chez l'homme.*

I. 1. 3 La sérotonine : synthèse et contrôle de la libération synaptique

Parmi les messagers chimiques existants (glutamate, dopamine, noradrénaline, acétylcholine…), la sérotonine appelée aussi 5-hydrotryptamine (5-HT) est l'un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central. La sérotonine est un dérivé d'un acide aminé, le tryptophane. Il est à remarquer qu'il y a relativement peu de neurones sérotoninergiques dans le cerveau mais qu'ils interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la régulation de l'humeur, le sommeil, le comportement sexuel [6-8], l'apprentissage [9] ainsi que dans divers désordres neuropsychiatriques comme l'anxiété, la dépression ou encore la schizophrénie [10-13].

La synthèse de sérotonine s'effectue en deux étapes. Le tryptophane est d'abord transformé en un intermédiaire appelé 5-HTP (5-hydroxytryptophane), par l'enzyme tryptophane hydroxylase. Le 5-HTP est alors converti en 5-HT par une autre enzyme, la 5-HTP-décarboxylase. La synthèse de la sérotonine est limitée par la quantité de tryptophane disponible dans le milieu extracellulaire baignant les neurones. La source du tryptophane est présent dans le cerveau est le sang, et la source du tryptophane présent dans le sang est alimentaire. Aussi, un déficit en trytophane dans l'alimentation conduit rapidement à une diminution des taux de sérotonine dans le cerveau et à des dysfonctionnements associés.

Pour contrôler la libération de sérotonine, il existe une série de mécanismes de régulation dont : (i) la recapture présynaptique par un système de transport actif qui nettoie la synapse de son excès de neurotransmetteur et d'en économiser la synthèse ; (ii) la destruction par des enzymes spécifiques (monoamine oxydase de type A, MAO-A) ; (iii) l'activation d'autorécepteurs présynaptiques (sur le bouton présynaptique ou plus en amont sur les corps cellulaires). Enfin, si le neurotransmetteur est libéré en trop grande quantité et/ou n'est pas bien éliminé, les récepteurs ont un mécanisme d'internalisation vers le compartiment intracellulaire qui leur permet de disparaître de la surface de la membrane et de ne pas être hyperactivés.

I. 1. 4 Les récepteurs du système sérotoninergique

Comme mentionné précédemment, les neurotransmetteurs sont synthétisés dans les neurones, puis stockés dans des vésicules synaptiques d'où ils sont libérés. Ils assurent la transmission du message nerveux en agissant sur des récepteurs. La sérotonine est libérée par les neurones sérotoninergiques au niveau :

¤ des terminaisons axonales : la libération est fonction de l'arrivée de potentiel d'action au niveau du bouton synaptique. La sérotonine agit alors sur le neurone post-synaptique, par exemple sur les neurones de l'hippocampe.

¤ des corps cellulaires : la libération est, pour l'essentiel, indépendante de l'état électrique du neurone. Elle agit sur le neurone présynaptique lui-même au niveau du raphé.

Quand la sérotonine active son récepteur, elle peut provoquer une excitation ou une inhibition du neurone qui le porte suivant la fonction inhibitrice ou excitatrice de ce récepteur. Les récepteurs de la sérotonine sont répartis actuellement en 7 familles distinctes ($5\text{-}HT_1$ à $5\text{-}HT_7$, Tableau IV.1).

Récepteur	Principales localisations	Mode d'action du récepteur
$5\text{-}HT_{1A}$	**Noyaux du raphé, structures limbiques**	**Inhibiteur**
$5\text{-}HT_{1D}$	Structures extrapyramidales	Inhibiteur
$5\text{-}HT_{1E}$	Tronc cérébral, striatum, hippocampe	Inhibiteur
$5\text{-}HT_{1F}$	Cortex frontal, hippocampe	Inhibiteur
$5\text{-}HT_{2A}$	Cortex frontal	Excitateur
$5\text{-}HT_{2B}$	Périphérie	Excitateur
$5\text{-}HT_{2C}$	Plexus choroids	Excitateur
$5\text{-}HT_3$	Bulbe rachidien, amygdale	Excitateur
$5\text{-}HT_4$	Substance noire, hippocampe	Excitateur
$5\text{-}HT_5$	Habenula, hippocampe	--
$5\text{-}HT_6$	Structures limbiques	(Excitateur)
$5\text{-}HT_7$	Hypothalamus, structures limbiques	(Excitateur)

Tableau IV.1 : *Différents récepteurs de la sérotonine, localisations principales et modes d'action des neurones portant ces récepteurs.*

I. 2 Les récepteurs $5\text{-}HT_{1A}$ dans le cadre des études sur la dépression

Les récepteurs de la classe $5\text{-}HT_1$ sont caractérisés par une affinité élevée pour la sérotonine : quelques nanomoles de sérotonine se fixant sur ces récepteurs suffisent à déclencher la réaction cellulaire commandée par ces récepteurs. Parmi ces récepteurs, les récepteurs sérotoninergiques du sous-type 1-A sont les plus étudiés [14]. Ils sont plus particulièrement exprimés au niveau des somas et des dendrites de neurones

sérotoninergiques qui sont localisés dans les noyaux du raphé : on les appelle alors autorécepteurs. Ils sont également situés au niveau des somas et des dendrites de neurones non-sérotoninergiques dans les structures limbiques telles que l'hippocampe [15] : on parle alors d'hétérorécepteurs. Les récepteurs 5-HT_{1A} ont notamment été étudiés dans le cadre de la dépression nerveuse. En effet, il a été établi qu'une baisse de l'activité des neurones sérotoninergiques, et donc de la transmission sérotoninergique, serait associée à certaines formes de dépression [4, 16]. Actuellement, pour traiter ce type de pathologie, la classe pharmaceutique des antidépresseurs la plus utilisée est celle des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS) qui permettent d'augmenter puis d'équilibrer la quantité de 5-HT synaptique disponible. Parmi ces antidépresseurs, on peut notamment citer la fluoxétine (Prozac®). Cependant, bien que cette classe d'antidépresseurs possède une efficacité thérapeutique chez la majorité des patients dépressifs, les psychiatres constatent systématiquement une première période de traitement caractérisée par un délai d'action de 2 à 3 semaines.

Des études pré-cliniques chez l'animal ont montré que, dans cette première période du traitement, l'inhibition de la recapture de la sérotonine libérée entraînerait une augmentation brusque et importante de la concentration extracellulaire en sérotonine. Cette augmentation stimulerait les autorécepteurs entraînant une inhibition des neurones sérotoninergiques dans le raphé et par conséquent, une diminution de la libération de sérotonine synaptique. A ce moment du traitement, l'état du patient ne s'améliore pas, puisqu'il reste encore moins de sérotonine disponible. Dans la seconde période, la poursuite du traitement de façon chronique diminuerait cette inhibition des neurones sérotoninergiques.

Pour suivre ces différentes études hypothétiques des effets des ISRS et identifier les mécanismes cellulaires et synaptiques sous-jacents, il est indispensable d'étudier, sur des modèles petits animaux, la transmission sérotoninergique par des molécules radiomarquées reconnaissant les récepteurs 5-HT_{1A}, comme le [^{18}F]-MPPF. Dans ces études, la β-MicroProbe est une méthodologie indispensable aux neurobiologistes pour quantifier ces molécules *in vivo* et, par le couplage à des techniques classiques des neurosciences (comme par exemple la microdialyse), de déterminer l'état d'activation du système sérotoninergique *in vivo*.

I. 3 Etapes de synthèse et validation du [^{18}F]-MPPF

Pour mettre en évidence les propriétés des récepteurs de la sérotonine, on synthétise des composés (des ligands) qui s'y lient spécifiquement et avec une affinité élevée. Ces ligands sont, soit des agonistes (ils reproduisent l'effet de la sérotonine), soit des antagonistes (ils s'opposent à son action). Ils permettent d'imiter l'action de la sérotonine, soit de l'inhiber en bloquant ses récepteurs. Dans le but de visualiser les effets produits et de quantifier les récepteurs, les expériences réalisées dans ce domaine font appel à la propriété d'affinité réciproque du récepteur et de son ligand (expériences dites de Binding ou de liaison). Par ces études de Binding, on cherche à déterminer la constante de dissociation Kd, qui représente l'affinité du ligand pour le récepteur et la concentration en récepteurs B_{max}. En effet, une variation du nombre de récepteurs et donc de la fixation des ligands peut être un signe sous-jacent à un phénomène physiologique ou pathologique.

Le développement des techniques TEP et TEMP a conduit à l'émergence du marquage radioactif de ces molécules. Ainsi, le traceur injecté est le ligand exogène par opposition à la sérotonine qui constitue le ligand endogène. Dans ce cadre, plusieurs agonistes et antagonistes ont été développés ces dernières années pour étudier les récepteurs 5-HT_{1A}. Nombreux sont ceux qui ont fait l'objet de radiomarquage mais beaucoup ont été des échecs [17]. Parmi les tentatives réussies, on peut notamment citer le WAY-100635. Au début des années 90, un nouvel antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, le MPPF, a été développé [18] puis marqué au ^{18}F [19]. Le développement du [^{18}F]-MPPF et l'optimisation de la procédure a ensuite été réalisée au laboratoire de radiopharmacologie du CERMEP en collaboration avec le Centre de Recherche du Cyclotron de Liège et le centre TEP de l'hôpital Erasme à Bruxelles. Le radiomarquage, basé sur une substitution nucléophile, s'effectue dans un automate placé en cellule blindée (temps de synthèse de 70 min) [20, 21]. Puis le [^{18}F]-MPPF est collecté, contrôlé (double détection : UV et radio) et conditionné sous forme de radiopharmaceutique injectable.

Le [^{18}F]-MPPF a été validé chez le rat anesthésié. Ces travaux ont démontré que le [^{18}F]-MPPF est un traceur fluoré stable *in vivo* après injection, passant rapidement la barrière hémato-encéphalique et ayant peu de métabolites fluorés cérébraux. Le [^{18}F]-MPPF a une grande sélectivité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et une affinité proche de celle de la sérotonine pour ce même récepteur (3,3 nM versus 4,17 nM). La distribution de ce ligand correspond aux densités déjà connues des récepteurs 5-HT_{1A} [22, 23]. La répartition de ce radiopharmaceutique chez le rat est notamment importante au niveau du raphé dorsal, de l'hippocampe ou du cortex entorhinal. Ainsi, le [^{18}F]-MPPF se fixe à la fois sur les récepteurs pré- et post-synaptiques.

I. 4 L'association [^{18}F]-MPPF et β-MicroProbe : une méthodologie pour quantifier les variations de la transmission sérotoninergique chez le petit animal *in vivo*

Afin d'étudier le système sérotoninergique *in vivo* chez le rat, l'équipe de L. Zimmer en collaboration avec notre équipe a entrepris d'utiliser et valider la β-Microprobe à l'aide du [^{18}F]-MPPF (§ II.1.2). Ces résultats probants ont incité l'équipe à poursuivre ces expériences menées *in vivo* pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au délai d'action des antidépresseurs.

Les premiers travaux ont eu pour but d'étudier l'effet d'une libération de sérotonine extracellulaire sur la fixation de [^{18}F]-MPPF. Une stimulation électrique du raphé induit une brusque libération de sérotonine extracellulaire au niveau du raphé (siège des autorécepteurs), confirmée par microdialyse [3], et une décroissance de la fixation spécifique du [^{18}F]-MPPF mesurée par la β-MicroProbe dans l'hippocampe (siège des hétérorécepteurs). En effet, la sérotonine extracellulaire libérée entre en compétition avec le [^{18}F]-MPPF qui est alors déplacé (Fig. IV. 3).

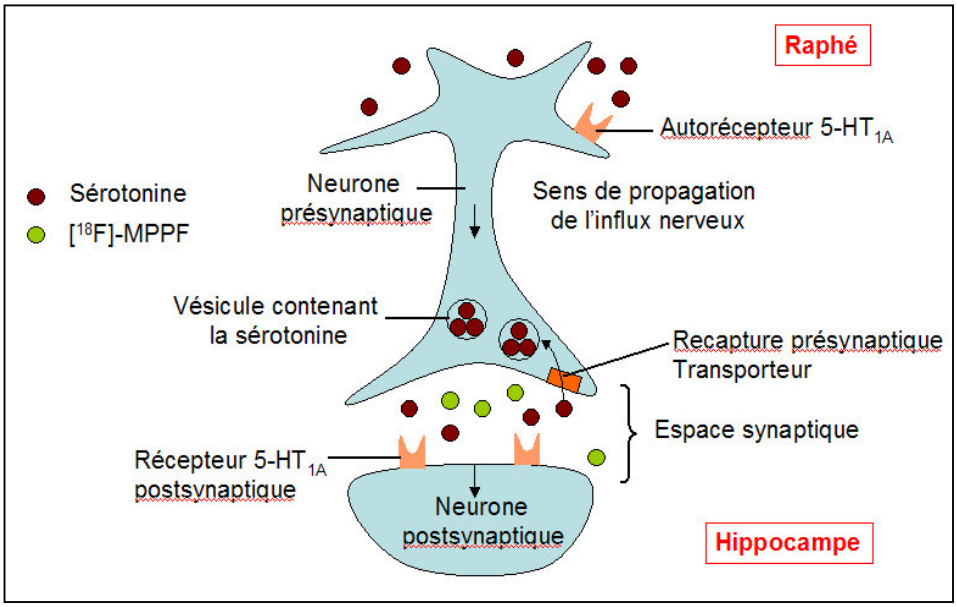


Figure IV.3 : *Etude de la transmission synaptique de sérotonine entre le raphé et l'hippocampe à l'aide du [^{18}F]-MPPF.*

Dans un deuxième temps, deux sondes β-MicroProbe ont été implantées, l'une dans l'hippocampe, l'autre au niveau du raphé pour étudier l'état d'activation des récepteurs 5-HT_{1A} par un agoniste, le 8-OH-DPAT [24]. Dans ce cas, l'acquisition débute au moment d'une injection aiguë de 8-OH-DPAT suivie 15 min après par l'injection du [^{18}F]-MPPF (Fig. IV.4). De façon étonnante, les mesures effectuées montrent une décroissance significative (~30%) du signal enregistré dans le raphé mais pas de changement au niveau de l'hippocampe. Il existe donc moins de sites de fixation disponibles pour le [^{18}F]-MPPF dans le raphé.

Or, une internalisation des récepteurs 5-HT_{1A} après l'administration aiguë du 8-OH-DPAT a été mise en évidence par une technique de microscopie électronique [24]. Cette internalisation (~34%) a uniquement lieu au niveau du raphé et non pas au niveau de l'hippocampe. Ainsi, la désensibilisation progressive des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} situés dans le noyau du raphé, pourrait être dûe à une internalisation des récepteurs (passage de la membrane vers le cytoplasme).

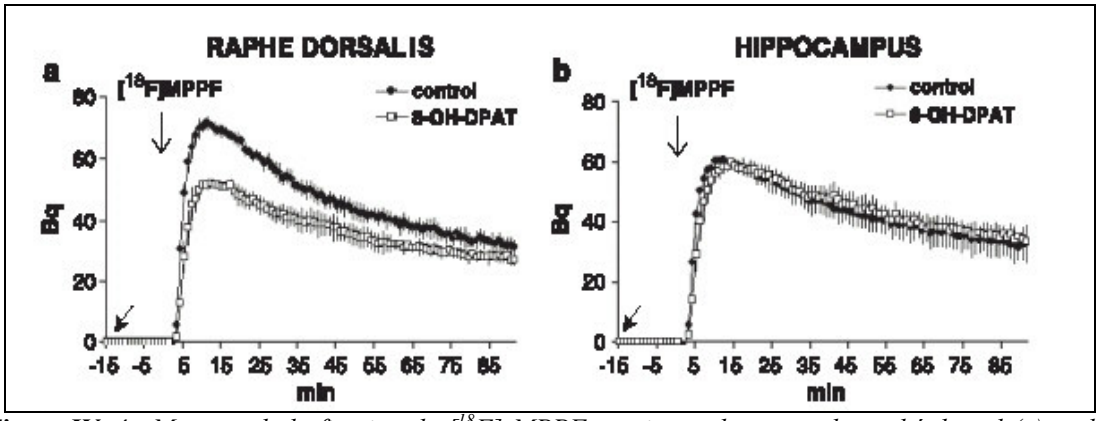


Figure IV. 4 : *Mesures de la fixation du [^{18}F]-MPPF au niveau du noyau du raphé dorsal (a) et de l'hippocampe (b) après traitement ou non avec le 8-OH-DPAT enregistrées par la β-MicroProbe.*

Dans une dernière étape, il restait à étudier si ces mécanismes se mettaient en place en présence des ISRS. De façon intéressante, l'internalisation des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau du raphé a en effet aussi été observée par l'injection aiguë de fluoxétine (prozac) (~36% in vitro par microscopie électronique). Les mesure *in vivo* effectuées par β-MicroProbe de la fixation du [^{18}F]-MPPF ont montré que la même injection de fluoxétine entraîne une diminution de 35% du signal dans le raphé sans changement dans l'hippocampe [25]. Il semblerait donc que l'internalisation des récepteurs 5-HT_{1A} après traitement d'un antidépresseur de type ISRS soit effectivement associée à une baisse de la fixation [^{18}F]-MPPF *in vivo*.

Les perspectives d'étude chez le petit animal sont maintenant centrées sur le passage d'un mode aigu d'administration de fluoxétine à un mode chronique pour mimer le mode d'administration des ISRS en thérapeutique. Il s'agira ensuite de mener sur ce nouveau modèle les expériences complémentaires d'enregistrement *in vivo* de fixation du [^{18}F]-MPPF par la β-MicroProbe et *in vitro* de microscopie électronique pour estimer l'internalisation des récepteurs.

II Validation expérimentale du couplage β-Microprobe/IRMa dans le cadre du système sérotoninergique

Le choix de l'étude de la faisabilité du couplage de mesures magnétiques et nucléaires dans le cadre de l'étude du système sérotoninergique innervant l'hippocampe a été motivé par la reproductibilité du marquage et de la cinétique du [^{18}F]-MPPF [1, 2, 23] et la possibilité de réaliser une mesure nucléaire simultanément à une acquisition d'images anatomiques de l'hippocampe et du cervelet, deux régions cérébrales à l'organisation structurale contrastée donc clairement visibles en IRMa.

Par contre, ce choix pose un problème de quantification tout à fait intéressant puisque le VD de la sonde ne s'inscrit pas entièrement dans l'hippocampe en raison de sa forme tridimensionnelle particulière en forme de "croissant". Pour aboutir à une quantification exacte, il est donc nécessaire de prendre en compte le signal issu des zones adjacentes à l'hippocampe. De plus, un autre facteur, à savoir l'hétérogénéité de la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} à l'intérieur même de l'hippocampe, doit également être considéré dans cette approche de quantification, et sera discuté en fin de chapitre.

Ce contexte neurophysiologique était extrêmement stimulant pour nos travaux puisque nous avons mené un travail de développement méthodologique en prenant en compte la complexité des structures cérébrales, complexité dans leur structure anatomique, dans leur innervation et dans la distribution des récepteurs cibles.

Dans cette partie, nous exposerons dans un premier temps le protocole expérimental appliqué, adapté aux études sous champ. Dans un second temps, nous présenterons les acquisitions pharmacologiques par la β-MicroProbe et les images IRMa obtenues simultanément sous champ. Enfin, nous discuterons ces données à la lumière des résultats effectués hors champ.

II. 1 Protocole expérimental

Plusieurs études préliminaires ont été menées chez le rat anesthésié sous champ avec une implantation chronique afin de mettre en place le protocole décrit sur la figure IV. 6.

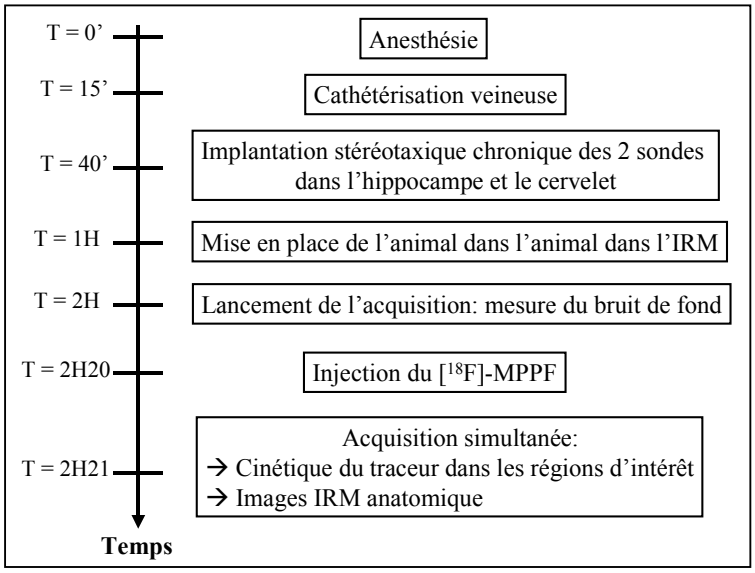


Figure IV.6 : *Description des étapes du protocole expérimental.*

Les rats faisant l'objet de cette étude sont des mâles Sprague-Dawley pesant entre 289 et 450 g. Ce paramètre est d'importance puisque le repérage stéréotaxique des structures cérébrales est basé sur les coordonnées de l'atlas de Paxinos et Watson [26]. Cet atlas, référencé par rapport au bregma*, contient 78 coupes cérébrales de référence, moyennées sur une centaine de rats de 270 à 310 g et peut être appliqué pour des rats males ou femelles de 250 à 350 g. Un rat dont le poids serait trop différent de cette fourchette aurait un impact non négligeable sur l'utilisation des coordonnées stéréotaxiques de référence.

Après injection intrapéritonéale d'uréthane (1.7 g/kg), une veine de la queue (veine caudale) est cathétérisée pour permettre l'injection du traceur. Le cathéter utilisé est relativement long (~70 cm de longueur) pour faciliter l'injection dans l'aimant. L'animal est ensuite placé dans un cadre stéréotaxique et immobilisé à l'aide de barres d'oreilles et d'un pince museau pour que la tête soit maintenue suivant l'axe horizontal (Fig. IV. 7).

* Point de rencontre de deux fissures cérébrales facilement repérable à l'œil.

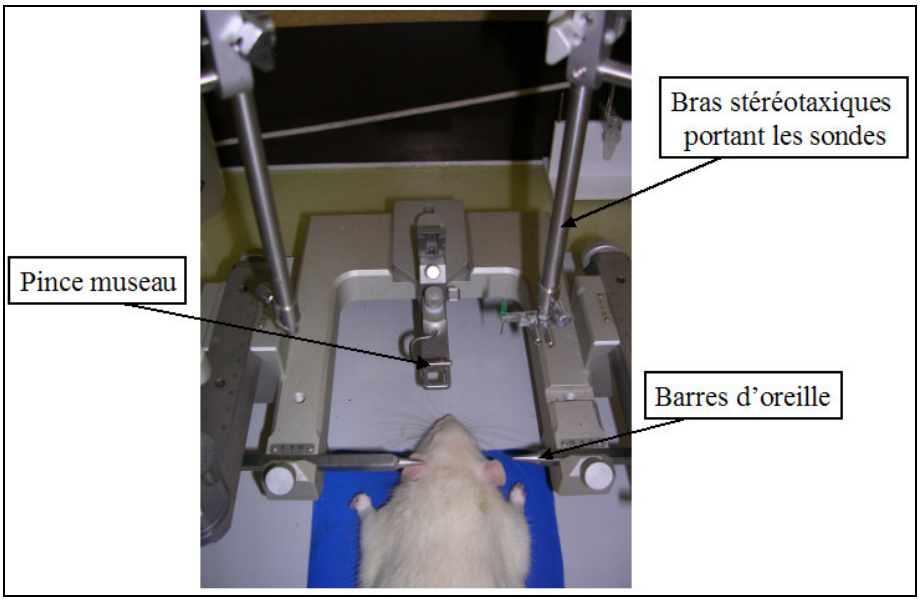


Figure IV.7 : *Placement du rat anesthésié dans le cadre stéréotaxique.*

Deux sondes de 500 µm de diamètre-1.0 mm de longueur de scintillateur et 8.0 mm de longueur total (cette longueur a été choisie pour minimiser l'encombrement dans l'IRM) sont alors placées stéréotaxiquement :

¤ l'une dans l'hippocampe, zone de marquage spécifique, selon les coordonnées suivantes : AP (antério-postérieur) : –5.0 mm, ML (médio-latéral) : –5.0 mm et DV (dorso-ventral) : –8.0 mm (Fig. IV. 8).

¤ l'autre dans le cervelet, zone de marquage non spécifique, selon les coordonnées suivantes :

AP : –13.0, ML : 3.0 et DV : –4.0.

Ne disposant pas de cadre stéréotaxique amagnétique dont l'encombrement aurait été de toute façon trop important dans ce contexte expérimental, nous avons effectué une implantation chronique des 2 sondes, stabilisées à l'aide d'un ciment (Dentalon). Il est nécessaire d'attendre 45 min avant fixation complète des sondes. Ainsi, ces mesures se différencient des mesures effectuées en aigu, où les bras stéréotaxiques maintiennent les sondes à demeure tout au long de l'expérience.

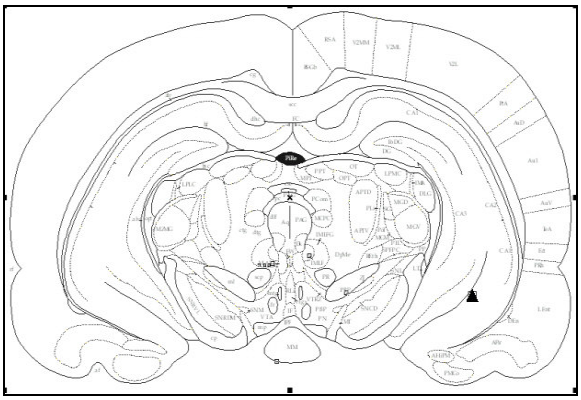


Figure IV.8 : *Zone d'implantation stéréotaxique dans l'hippocampe repérée (triangle noir) à l'aide d'une coupe coronale de l'atlas de rat.*

L'étape suivante consiste à installer l'animal sur une couverture chauffante dans un lit adapté au diamètre de l'antenne réceptrice (diamètre 72 mm). Un capteur de pression placé sous l'abdomen est également mis en place pour suivre la fréquence respiratoire tout au long de l'expérience. La réception du signal RMN se fait par l'intermédiaire d'une antenne de surface disposant d'un trou en son centre, permettant le passage des deux guides de 8 m (Fig. IV.9). Les guides sont alors maintenus légèrement courbés afin que le tout puisse être disposé dans l'aimant, l'antenne étant au niveau précis de l'endroit où le champ est à 7-T. A ce niveau, la manipulation de l'animal doit être minutieuse puisque tout saignement serait source d'artefact important pour la détection du signal RMN. L'entrée de l'IRM est ensuite obturée par un drap noir pour que les sondes ne soient pas sensibles à la lumière, laissant uniquement passer les 2 guides et le cathéter. Enfin, la β-MicroProbe est mise sous tension, au-delà de la barrière des 5 Gauss (éloignement à 8 m), pour caractériser le bruit de fond en l'absence du traceur radioactif pendant une vingtaine de minutes.

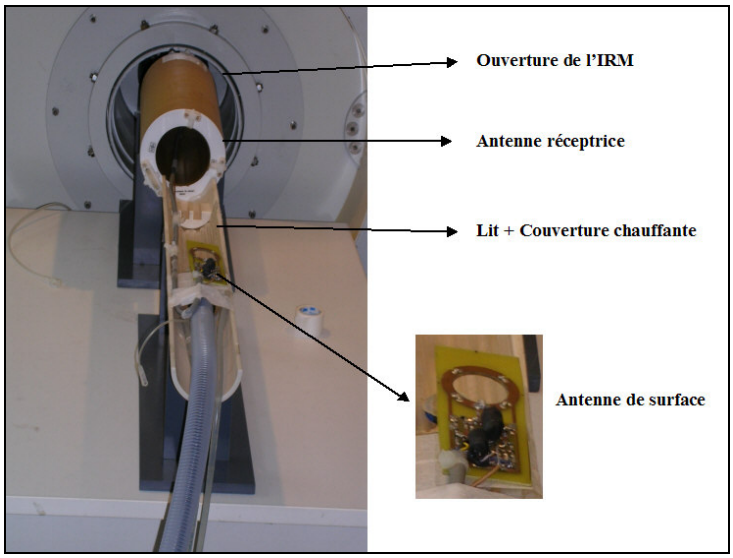


Figure IV.9 : *Dispositif expérimental permettant les acquisitions IRMa.*

Commencent alors la détermination des séquences IRMa et le repérage des coupes : simultanément aux acquisitions IRMa, le [^{18}F]-MPPF est injecté puis le volume mort restant dans le cathéter est poussé par du sérum physiologique. Il est alors possible de suivre, en temps réel, l'accumulation du traceur dans les deux zones d'intérêt et de réaliser les images IRMa. Une fois ce protocole établi, deux expériences sous champ ont été itérées et sont présentées ci-après.

II. 2 Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF simultanément à l'acquisition des images IRMa

II. 2. 1 Cinétique de fixation du [^{18}F]-MPPF sous champ : description des séquences IRM et des courbes d'activité hippocampe versus cervelet

Les cinétiques d'accumulation du [^{18}F]-MPPF (injection de 1.9 mCi d'activité dans un volume d'environ 400 µL) dans l'hippocampe et le cervelet d'un rat anesthésié sous

uréthane et placé dans l'aimant de 7-T sont présentées sur la figure IV.10. Ces courbes sont corrigées du bruit thermique des photodétecteurs, de la décroissance radioactive du ^{18}F ($T_{1/2}$ = 110 min) et de la différence de sensibilité entre les deux sondes (la sonde de l'hippocampe étant prise comme référence). Les données sont moyennées toutes les minutes pour une meilleure lisibilité. La cinétique de fixation spécifique du [^{18}F]-MPPF sur les récepteurs 5-HT_{1A} de l'hippocampe est alors obtenue en soustrayant la fixation non spécifique (marquage dans le cervelet) de la cinétique d'accumulation du traceur dans l'hippocampe (marquage spécifique + marquage non spécifique).

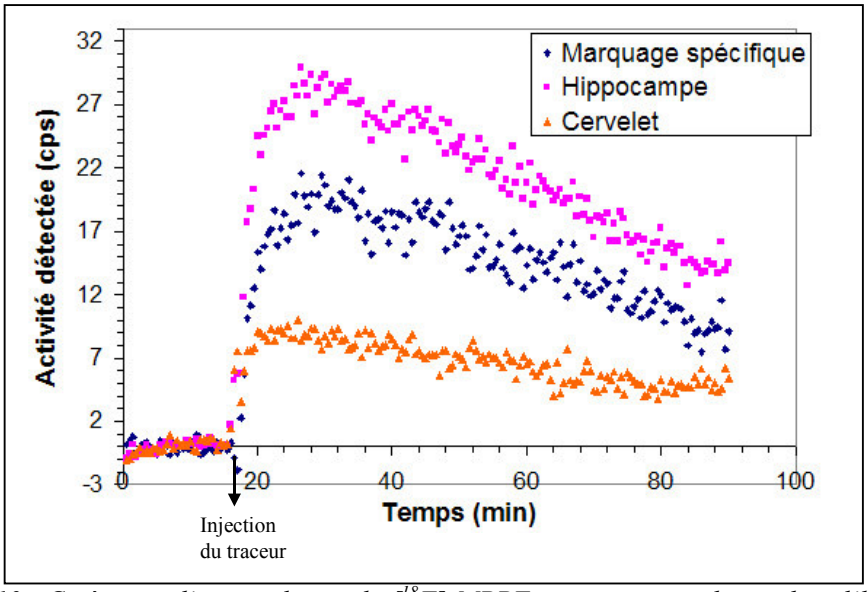


Figure IV.10 : *Cinétiques d'accumulation du [^{18}F]-MPPF acquises sous champ dans l'hippocampe et le cervelet.*

Quelques secondes après l'injection, on observe l'arrivée du traceur dans les structures, où les sondes sont implantées. Après 5 min, la concentration en traceur dans le cervelet commence à décroître, traduisant la clairance des molécules radioactives non fixées (élimination du marquage non spécifique). La concentration en traceur dans l'hippocampe augmente pendant une dizaine de minutes avant de diminuer progressivement. A 30 min, le rapport entre le signal mesuré au niveau de l'hippocampe et du cervelet est d'environ 3.5, ce qui est cohérent avec les valeurs publiées *ex vivo* [23] ou *in vivo* [1, 27]. Le marquage spécifique est à son maximum entre 15 et 25 min après injection, correspondant à un équilibre entre le ligand lié au récepteur et le ligand libre. La décroissance du marquage indique que le traceur ne reste pas lié au récepteur et est progressivement dégradé et éliminé.

Une première acquisition IRM (séquence dénommée TRI-PILOT) est réalisée environ 10 min avant l'injection pour effectuer un repérage selon les trois coupes axiales, sagittales et coronales. Cette étude nous permet :
(i) de vérifier le centrage de l'animal par rapport au centre magnétique de l'image,
(ii) d'évaluer le champ d'action de l'antenne de surface (l'antenne est-elle bien placée par rapport au cerveau et y a t-il assez de signal),
(iii) de positionner les outils d'acquisition pour les séquences suivantes.
Ensuite, des acquisitions IRMa de différentes durées, champ de vue, résolution spatiale, sont réalisées simultanément aux prises de données pharmacologiques.

On peut notamment citer les séquences :
¤ T2_RARE16_3D (champ de vue : 2.5*2.5*2.0 cm, durée d'acquisition = 26 min) d'une résolution spatiale de 195*195*312 µm/pixel,
¤ T2_3Dslab2 (champ de vue : 1.79*2.69*2.0 cm, durée d'acquisition = 43 min) d'une résolution spatiale de 140*140*289 µm/pixel ou encore,
¤ T2_RARE_8_FS_AX (champ de vue : 2.56*1.92*1.6 cm, durée d'acquisition = 38 min) d'une résolution spatiale de 100*100*400 µm/pixel.

Ces séquences nous permettent d'obtenir en 3-D des images très résolues avec un bon contraste, comme présentées sur la figure IV. 11. Les structures comme l'hippocampe ou le cortex sont aisément repérables, tout comme le cervelet. Ces images nous ont également permis de repérer un hématome autour de la sonde lors d'une des expériences, expérience que nous n'avons donc pas prise en compte. On voit ici tout l'intérêt de l'observation *in situ* et en ligne des images anatomiques IRM.

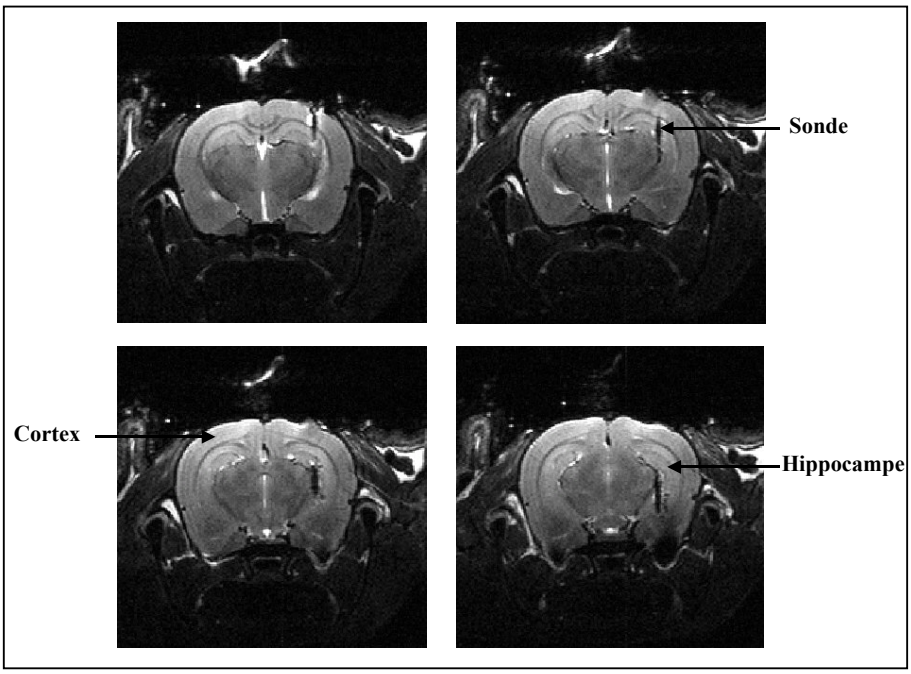


Figure IV.11 : *Images en T2 d'IRMa montrant l'endroit d'implantation d'une sonde de 500 µm dans l'hippocampe (117*117*500 µm). La sonde est légèrement inclinée et est visible sur plusieurs coupes.*

II. 3 Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF hors champ et comparaison aux courbes sous champ

Dans un second temps, nous avons comparé les études réalisées sous champ avec des études "témoins" réalisées hors champ et effectuées selon le même protocole avec :
(i) l'utilisation d'un cathéter assez long pour l'injection du traceur,
(ii) l'implantation chronique des deux sondes stabilisées à l'aide d'un aimant,
(iii) l'utilisation de deux guides de 8 m.

L'ensemble des courbes témoins (N = 4) et sous champ (N = 2) a été divisé par la sensibilité de la sonde hippocampe pour obtenir les données en kBq/mL. Pour comparer l'allure des cinétiques dans les deux cas, nous avons normalisé les courbes par rapport au temps d'injection, à un temps donné sur le plateau (t = 56 min c'est-à-dire 20 min après injection), et à la courbe témoin n=°1 qui présente la plus grande stabilité d'enregistrement. Les courbes témoins et IRM ainsi que les moyennées "témoins versus IRM" sont présentées sur la figure IV. 12.

Dans ces conditions, on retrouve une description tout à fait conforme à celle que nous avions décrite pour la courbe de la figure IV. 10 avec des profils de cinétiques de marquage spécifique du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe similaires entre acquisitions témoins et acquisitions sous-champ. Dans les grandes lignes, on peut voir que la concentration en [^{18}F]-MPPF (en kBq/mL) augmente rapidement avant d'atteindre un plateau 15 minutes après injection avant de décroître environ 30 minutes après injection.

Ces expériences montrent donc la stabilité du signal sous champ et démontrent la faisabilité biologique du couplage simultanée entre acquisitions pharmacocinétiques et IRMa.

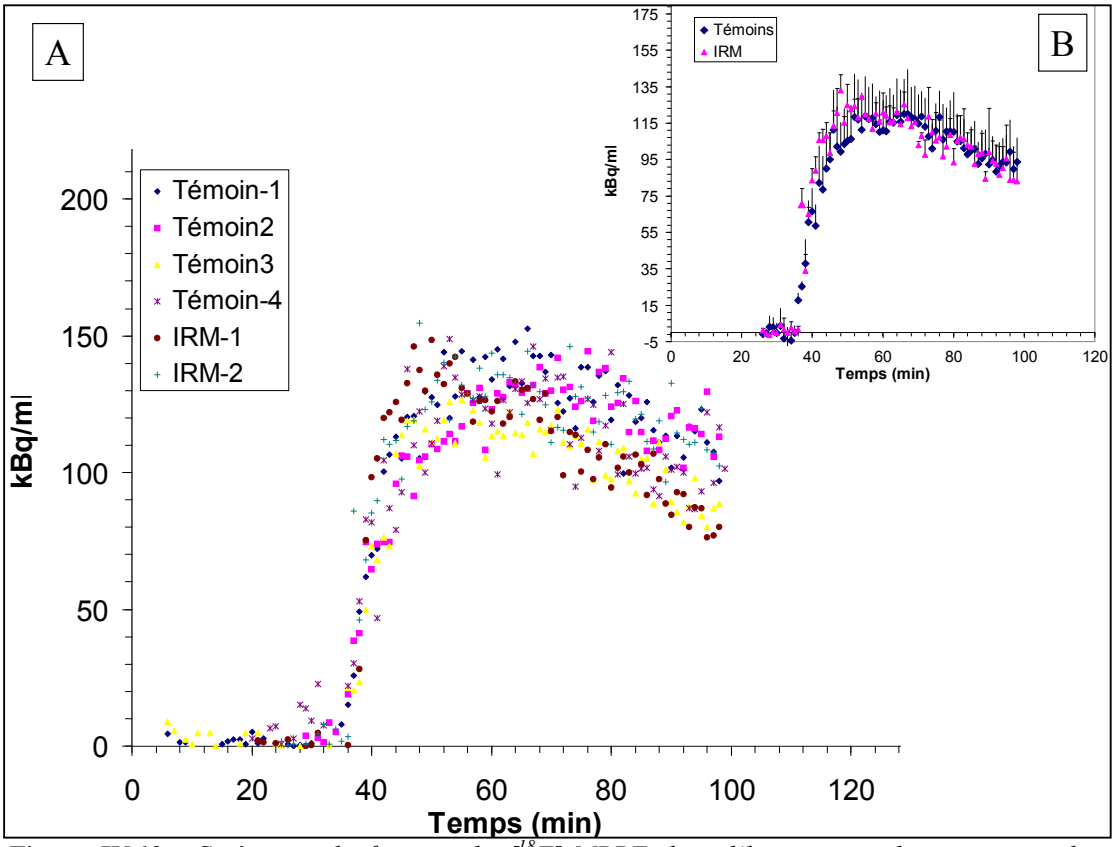


Figure IV.12 : *Cinétiques de fixation du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe hors et sous champ normalisées au plateau (t=56 min) (A) et moyennes "témoins versus IRM" (B).*

II. 4 Discussion sur la variabilité interindividuelle des enregistrements

Si l'on observe de plus près les courbes "brutes", uniquement normalisées par rapport au temps d'injection (Fig. IV.13), on constate une différence de concentrations qui peut paraître relativement importante pour certaines courbes : par exemple, variation de 63 et 134 kBq/mL, 25 min après injection, notamment entre la courbe "témoin-1" et les courbes "témoin-3" et "IRM-2".

Nous allons décrire ici les facteurs de variation qui peuvent expliquer ces différences de quantification *in vivo*, différences qui ont motivées le travail de développement que nous avons effectué pour la création d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat (cf. §III). Ces facteurs sont:

(i) l'implantation stéréotaxique des sondes : les implantations chroniques sont plus délicates à réaliser qu'en aiguës puisque la sonde doit être laissée à demeure. Le retrait du bras stéréotaxique peut entraîner une modification par rapport aux coordonnées initiales notamment dans le plan dorso-ventral. Nous détaillerons ce facteur essentiel dans la partie suivante (cf. §III).
(ii) la variation des activités spécifiques des solutions radioactives injectées lors des différentes expériences est aussi à considérer puisqu'elles varient entre 1.35 et 6.5 Ci/µmol.
(iii) enfin, la variabilité du poids de l'animal, entre 289 et 450 g (360 ± 64 g) entre aussi en compte : plus le poids de l'animal est important, plus il est difficile d'avoir une implantation précise des sondes.

Nous allons à présent nous intéresser au premier point cité à savoir la quantification de la concentration radioactive dans l'hippocampe selon l'endroit d'implantation de la sonde, en commençant par une description des outils spécifiques que nous avons développés.

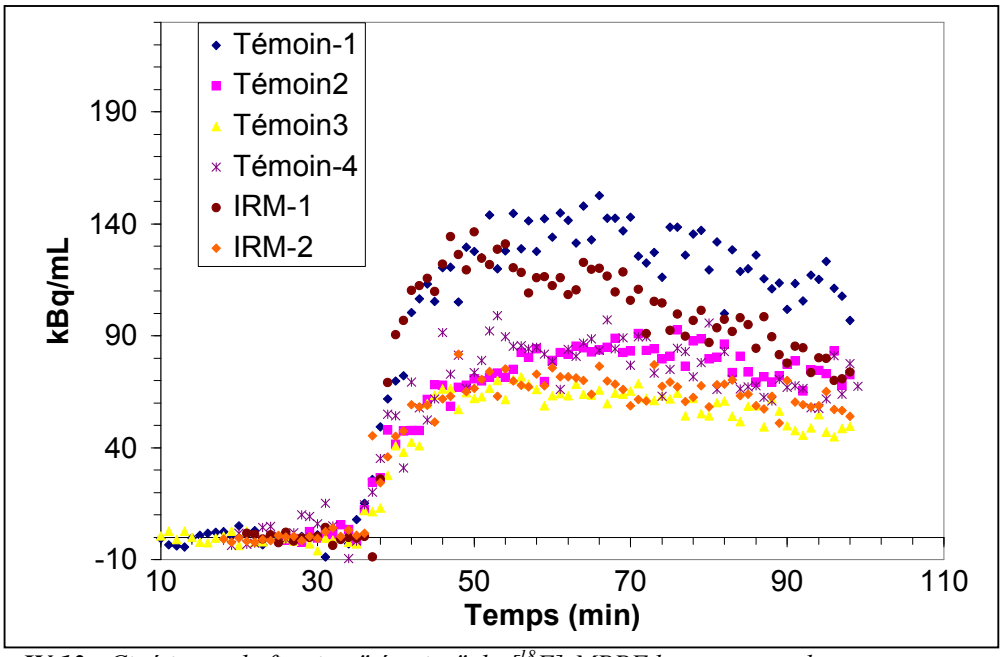


Figure IV.13 : *Cinétiques de fixation "témoins" du [^{18}F]-MPPF hors et sous champ.*

III Quantification absolue de la concentration en molécules radiomarquées in vivo : nécessité du développement d'un fantôme voxelisé

Comme évoqué au chapitre II, la quantification de la cinétique du traceur doit être considérée selon deux configurations possibles. La première correspond au cas le plus favorable où le volume de détection est entièrement compris dans la région d'intérêt (par exemple le striatum). Dans le second cas, seule une partie du volume de détection est située dans la structure que l'on étudie. Le signal détecté par la β-MicroProbe est alors composé des positons issus de la structure cérébrale d'intérêt et des positons provenant des tissus adjacents mais inclus dans le volume de détection. Pour extraire la concentration radioactive absolue, il est nécessaire de quantifier la contribution de chacune des sources de signal. Dans ce but, nous proposons une méthode basée sur l'utilisation d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat pour améliorer la quantification du signal radioactif. Nous allons d'abord décrire le principe des méthodologies développées suivie de l'application dans le cadre de la détection du [^{18}F]-MPPF hippocampique par la β-MicroProbe.

III. 1 Méthodologies développées pour la quantification du signal radioactif

III. 1. 1 Fantôme de cerveau de rat voxelisé

Le fantôme de cerveau de rat voxelisé est basé sur l'atlas de cerveau de rat de Paxinos et Watson [26], qui est composé des 78 coupes coronales délimitant les structures du cerveau pour un rat mâle Wistar pesant 290 ± 20g. Ces coupes ont été segmentées manuellement, à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Amira 3.1), en 16 régions d'intérêt incluant les principaux noyaux dopaminergiques et sérotoninergiques. Les caractéristiques de cette segmentation sont résumées dans le tableau IV.2 [28]. Les coupes de l'atlas de Paxinos et Watson n'étant pas équidistantes, une interpolation 3-D a été réalisée pour produire 107 coupes coronales segmentées, chacune séparée de 200 µm. Le fantôme final forme une matrice de 54*78*107 voxels cubiques de 200 µm de côté.

Le fantôme voxelisé de cerveau de rat a été implémenté dans les codes de simulation Monte Carlo MCNP [28] et Geant4. Dans ce dernier cas, les voxels ont été regroupés afin de réduire le temps de calcul lié aux interfaces (réduction d'un facteur 10). Cependant, le calcul de la matrice des efficacités locales de détection par simulation Monte Carlo pour la radioactivité β est important (plusieurs heures à plusieurs jours). C'est pourquoi nous avons finalement adopté une autre stratégie, basée sur l'utilisation de matrices pré-calculées (cf. VD chap.III §II) superposées à la matrice du fantôme de cerveau de rat voxelisé. Pour implémenter cette méthode, nous avons développé une interface dénommée β-Assistant sous Matlab (Fig. IV. 14).

Structures du cerveau	Nombre de voxels	Volume (µl)
Cortex et autres tissus cérébraux	162534	1300.3
Corps calleux	6673	53.4
Striatum	11468	91.7
Globus Pallidus	1292	10.1
Ventricule Latéral	1252	10.0
Capsule Interne	1905	15.2
Hippocampe	13553	108.4
Bulbe Olfactif (coupé)	7739	61.9
Ventricule Olfactif	17	0.1
Noyau Accumbens	1260	10.1
Substantia Nigra	852	6.8
Colliculus	2491	19.9
Aqueduct	95	0.8
Noyau Raphe Dorsal Raphe	202	1.6
Cervelet	29287	237.3

Tableau IV.2 : *Caractéristiques du fantôme de cerveau de rat (taille des voxels : 0.2*0.2*0.2 mm).*

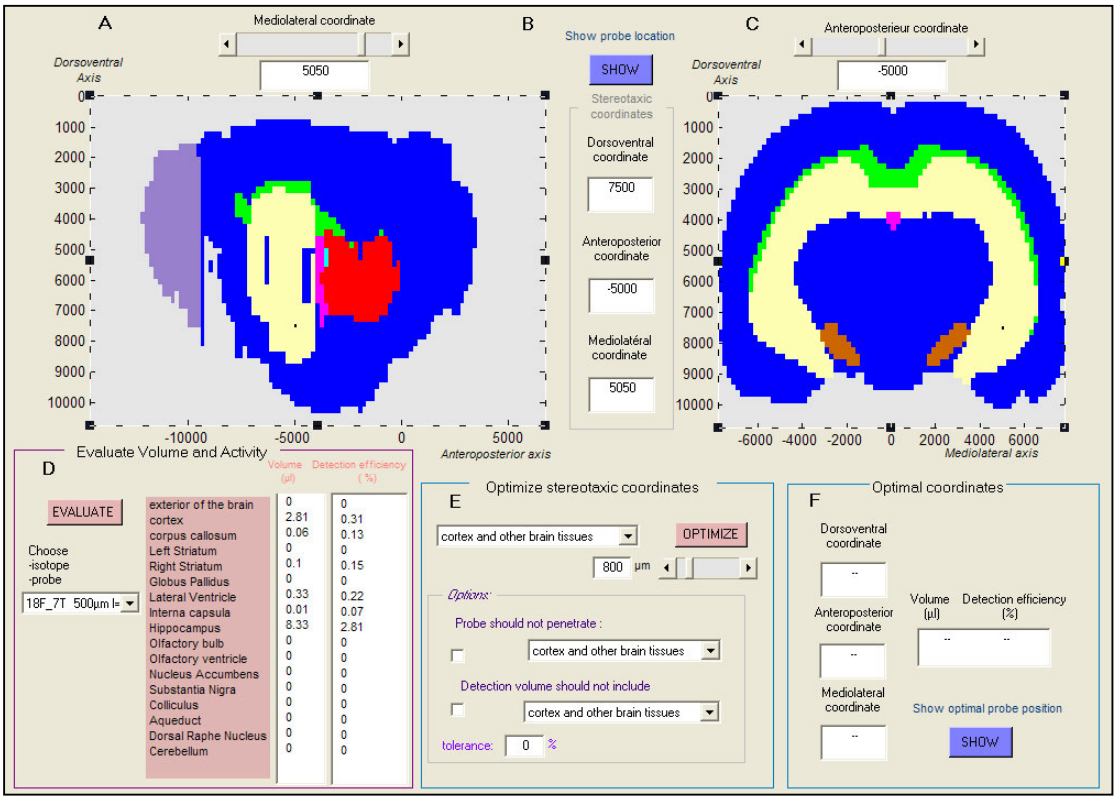


Figure IV.14 : *Interface du β-Assistant.*

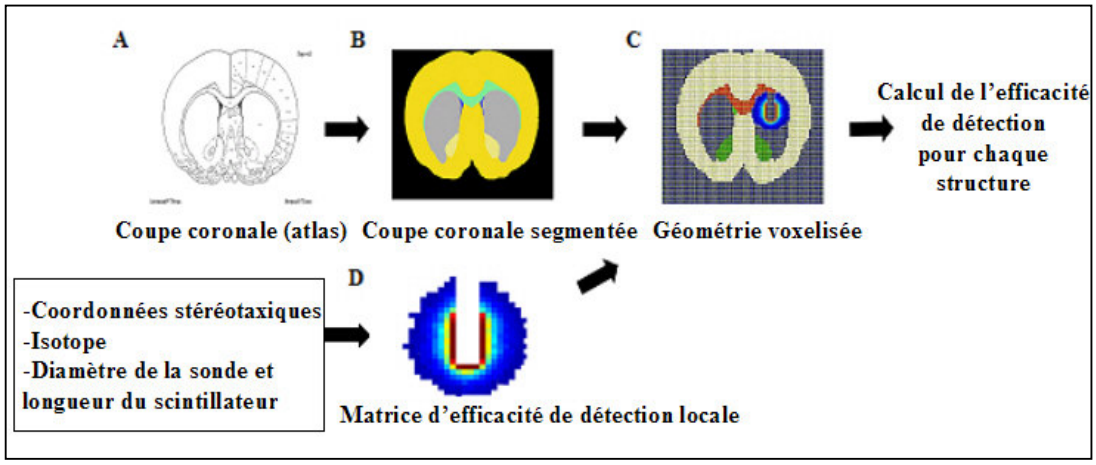


Figure IV. 15 : *Principe du β-Assistant basée sur la matrice de cerveau de rat voxelisé et la matrice d'efficacité de détection locale .*

La figure IV. 15 résume le principe du β-Assistant. Ce programme permet de calculer l'efficacité de détection de la sonde pour chaque structure visée sur la base du fantôme voxelisé de cerveau de rat (Fig. IV.15 C). Le Volume de détection (VD) correspondant à la matrice d'efficacité locale a été déterminé pour différents isotopes et diamètres de sondes. Dans notre cas, nous utiliserons le VD correspondant à une sonde de 500 µm de diamètre avec une partie sensible de 1.0 mm pour du ^{18}F à 0-T ou 7-T (Fig. IV. 15 D). Pour maintenir des temps de calcul Monte Carlo raisonnable, les VD ont été effectués dans des volumes contribuant pour 99% du signal. Une fois les coordonnées stéréotaxiques choisies, on peut déterminer quelles sont les structures incluses dans le VD et l'efficacité locale $\varepsilon_j(\mathbf{r})$ associée à celle-ci.

Ainsi, le signal total M(**r**, t) provenant des positons émis dans le volume de détection est la somme des contributions de chaque structure (éq. IV. 1).

$$M(\mathbf{r}, t) = \sum_i M_i(\mathbf{r}, t) \qquad \text{(IV. 1)}$$

La contribution au signal des positons émis dans une structure cérébrale i est donnée par :

$$M_i(\mathbf{r}, t) = V_{vox} \sum_j^{Ni} \varepsilon_j(\mathbf{r})\, C_j(t) \qquad \text{(IV. 2)}$$

où Ni est le nombre total de voxels de la structure i, $\varepsilon_j(\mathbf{r})$ est l'efficacité locale de détection associée au voxel j. Chaque voxel est un volume cubique V_{vox} rempli avec une concentration radioactive $C_j(t)$.

Considérant que la sonde soit à une position **r**, nous définissons Nt comme le nombre de voxels de la structure i inclus dans le volume de détection (c'est-à-dire les voxels de la

structure i pour lesquels l'efficacité locale n'est pas nulle). Alors, $E_i(\mathbf{r})$, l'efficacité de détection apparente est définie comme :

$$E_i(\mathbf{r}) = \frac{1}{Nt} \sum_{j=1}^{Nt} \varepsilon_j(\mathbf{r}) \qquad \text{(IV. 3)}$$

Faisant l'hypothèse que l'activité bêta est de concentration homogène $C_i(t)$ dans la structure i, on obtient :

$$M_i(\mathbf{r}, t) = Nt\, V_{vox}\, E_i(\mathbf{r})\, C_i(t) = V_t\, E_i(\mathbf{r})\, C_i(t) \qquad \text{(IV. 4)}$$

où V_t est le volume de tissus de la structure i inclus dans le volume de détection.

La partie suivante est consacrée à l'application de ce programme dans le cas d'études de la fixation du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe détectée par la β-MicroProbe sous aimant.

III. 2 Résultats dans le cadre des études couplées β-MicroProbe/IRMa

Comme nous l'avons vu précédemment, afin d'obtenir une meilleure quantification, nous devons calculer la sensibilité apparente des sondes dans l'hippocampe et le cervelet, c'est-à-dire la sensibilité pour les tissus de ces structures inclus dans le VD.

A partir des coordonnées précédemment présentées pour l'hippocampe (AP : –5.0 mm, ML: –5.0 mm et DV : –8.0 mm), le tableau IV. 3 synthétise, les volumes de chaque structure inclus dans le VD d'une sonde de 500 µm de diamètre ainsi que leurs efficacités de détection apparentes associées. On peut noter que le VD total correspond pour le ^{18}F (cf. chap.III) est de 16.96 µl hors champ et 11.63 µl sous 7-T (correspondant à 99% du signal détecté).

Si l'on considère une concentration homogène de 1kBq/mL dans tout le cerveau (ce qui correspond théoriquement à une expérience de calibration), l'équation IV.1 et IV.4 et les résultats du tableau IV.4 nous amènent à une sensibilité de 0.253 cps/kBq/mL hors champ et 0.243 cps/kBq/mL sous champ.

Bien que l'hippocampe constitue la principale source de signal, seul 10.75 µl est inclus dans le VD (16.96 µl). Dans les expériences réalisées, nous avons vu que nous avions un rapport de 3.5, 30 min après injection. Si l'on fait l'hypothèse que la fixation non spécifique peut être évaluée à partir de l'activité du cervelet, la concentration radioactive dans les tissus autres que l'hippocampe, inclus dans le VD, peut être considérée comme similaire à celle du cervelet. Ainsi, la contribution du signal issu des positons émis dans les zones adjacentes de l'hippocampe peut être calculée selon l'équation IV.4 et s'avère être inférieure à 2%. A partir du tableau IV.4 et de l'équation IV.4, une concentration de 1 kBq/mL dans l'hippocampe nous donne une sensibilité apparente de 0.236 cps/kBq/mL hors champ et 0.234 cps/kBq/mL sous champ. Nous avons donc ici une sous-estimation du signal de près de 7% hors champ et 4% sous champ.

Structure cérébrale	Sonde dans l'hippocampe (0-T)		Sonde dans l'hippocampe (7-T)	
	V_t Volume inclus dans le volume de détection (µl)	$E_i(\mathbf{r})$ Efficacité de détection apparente (%)	V_t Volume inclus dans le volume de détection (µl)	$E_i(\mathbf{r})$ Efficacité de détection apparente (%)
Hippocampe	**10.75**	**2.2**	**8.33**	**2.81**
Ventricule latéral	0.43	0.26	0.33	0.22
Corps calleux	0.16	0.22	0.06	0.13
Striatum	0.15	0.14	0.10	0.15
Capsule interne	0.08	0.16	0.01	0.07
Substantia nigra	0.01	0.11	0.00	0.00
Cortex et autres structures	5.38	0.27	2.81	0.31

Tableau IV.3 : *Evaluation à l'aide du β-Assistant des efficacités de détection apparentes pour une sonde de 500 µm implantée dans l'hippocampe selon les coordonnées stéréotaxiques AP : –5.0 mm, ML: –5.0 mm et DV : –8.0 mm lors d'expériences réalisées hors et sous champ magnétique.*

En ce qui concerne le cervelet, la prise en compte des coordonnées stéréotaxiques (AP : –13.0, ML : 3.0 et DV : –4.0) et des données du tableau IV.4 nous amène, pour une concentration homogène de 1kBq/mL dans cette structure, à une sensibilité apparente de 0.245 cps/kBq/mL hors champ et 0.238 cps/kBq/mL sous champ. On voit alors que par rapport à une calibration dans un bécher, on a une sensibilité légèrement inférieure et par conséquent, une légère sous-estimation du signal.

Structure cérébrale	Sonde dans le cervelet (0-T)		Sonde dans le cervelet (7-T)	
	V_t Volume inclus dans le volume de détection (µl)	$E_i(\mathbf{r})$ Efficacité de détection apparente (%)	V_t Volume inclus dans le volume de détection (µl)	$E_i(\mathbf{r})$ Efficacité de détection apparente (%)
Cervelet	**14.26**	**1.72**	**9.97**	**2.39**
Extérieur du cerveau	2.7	0.27	1.66	0.29

Tableau IV.4 : *Evaluation à l'aide du β-Assistant des efficacités de détection apparentes pour une sonde de 500 µm implantée dans le cervelet selon les coordonnées stéréotaxiques AP : –13.0 mm, ML: 3.0 mm et DV : –4.0 mm lors d'expériences réalisées hors et sous champ magnétique.*

Cependant, dans le cadre d'une structure cérébrale extrêmement hétérogène comme l'hippocampe, il est crucial de considérer exactement les coordonnées stéréotaxiques afin d'obtenir une quantification absolue. Nous avons déterminé l'influence de ces coordonnées stéréotaxiques sur la sensibilité apparente de détection selon diverses configurations. La figure IV. 16 présente différents coupes, correspondant chacune à une coordonnée dorso-ventrale, normalisées à la sensibilité obtenue à la position optimale (DV : -7.3 mm, ML : 5350 mm, AP : -5500 mm). Ainsi, une imprécision de près de 500 µm dans les trois directions peut rapidement nous amener à une diminution de 20 à 40 % de la sensibilité de détection apparente.

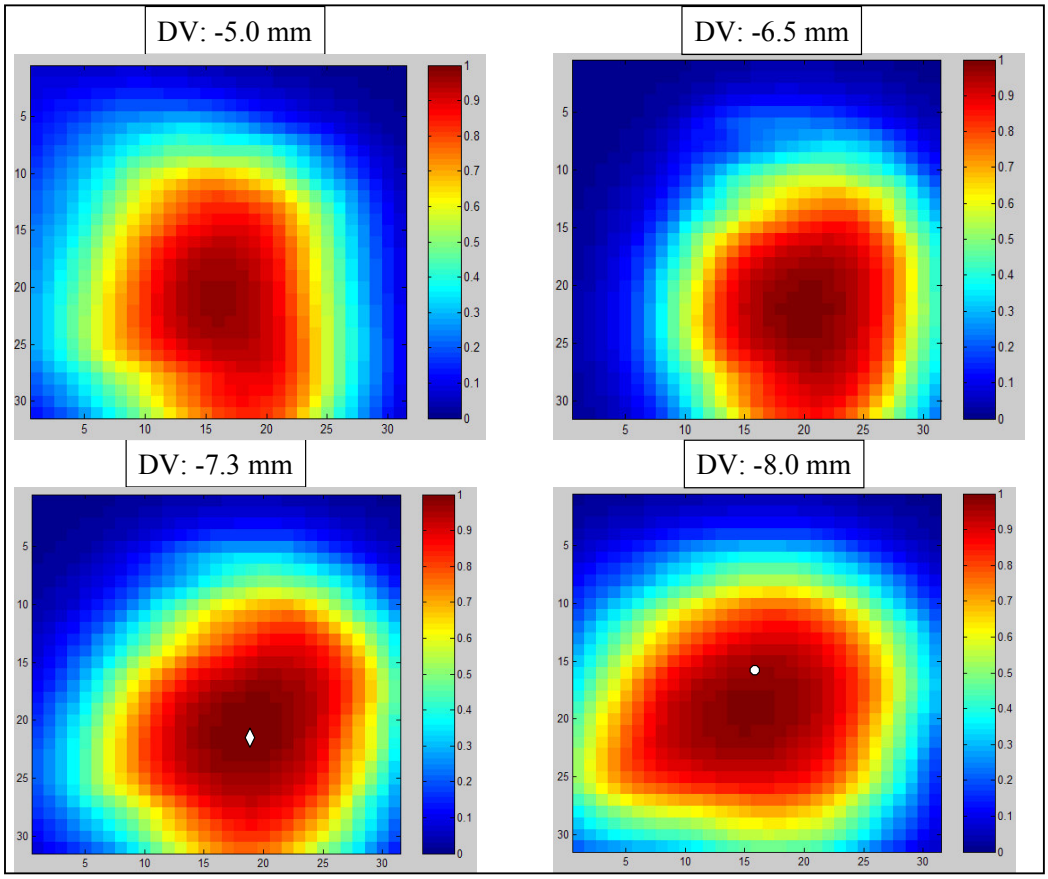


Figure IV. 16 : *Influence des coordonnées stéréotaxiques sur la sensibilité apparente dans l'hippocampe par rapport à la coordonnée initiale (carré blanc en bas à droite). Les sensibilités sont normalisées à celle de la position optimale (losange blanc en bas à gauche, cette position correspond à une valeur de 1 sur l'échelle colorée indiquée sur la droite de chaque image). L'axe des abscisses correspond au plan médio-latéral et l'axe des ordonnées au plan antéro-postérieur.*

Dans notre cas, les expériences réalisées sous champ nous ont permis de visualiser l'emplacement des sondes et de remarquer que les sondes n'étaient pas placées exactement selon les coordonnées initiales, notamment en dorso-ventral. En effet, les sondes sont implantées moins profondément que prévues dans l'hippocampe dans les deux cas (DV : -6.3 mm, AP : 5.1 mm et ML : 5.0 mm) ainsi que dans le cervelet dans le cas de l'"IRM-1" (DV : -2.6 mm, AP : -13.0 mm et ML : 3.0 mm). Avec les coordonnées déterminées selon les IRMa, nous avons déterminé les efficacités de détection apparentes pour chacune d'entre elles :

¤ Hippocampe "IRM-1" et "IRM-2": $V_t = 6.47$ µl ; $E_i(\mathbf{r}) = 0{,}181$. Ce qui nous donne une diminution de la sensibilité calculée en bécher de près de 25%.

¤ Cervelet "IRM-1" : $V_t = 5.39$ µl ; $E_i(\mathbf{r}) = 0{,}120$. Dans ce cas, on a une diminution de près de 50% de la sensibilité calculée en bécher.

Ainsi dans le cas de l'"IRM-2", on a une sous-estimation du signal au niveau de l'hippocampe et dans le cas de l'"IRM-1", on a une sous-estimation du signal à la fois au niveau de l'hippocampe et du cervelet.

En prenant en compte ces paramètres, on calcule alors le marquage spécifique M_{spe} à l'aide des sensibilités apparentes de l'hippocampe SA_{hip} et du cervelet SA_{cerv}, c'est-à-dire selon l'équation IV. 5 :

$$M_{spe} = [M_{hip} - (SA_{hip} / SA_{cerv}) * M_{cerv})] * 2^{\wedge t/T} \quad \text{(IV. 5)}$$

avec M_{hip} : nombre de coups mesuré par la sonde implantée dans l'hippocampe corrigée du bruit de fond et M_{cerv} : nombre de coups mesuré par la sonde implantée dans le cervelet corrigée du bruit de fond, t le temps de l'acquisition et T la période du ^{18}F.

On obtient la concentration en radioactivité C_{hip} dans l'hippocampe (en kBq/mL), en divisant M_{spe} par SA_{hip} (éq. IV.6).

$$C_{hip} = M_{spe} / SA_{hip} \quad \text{(IV. 6)}$$

La figure IV. 16 présente les deux courbes réalisées sous champ obtenues à partir de l'équation IV. 6. On peut voir que la prise en compte des coordonnées stéréotaxiques "réelles" déterminées par IRM et l'évaluation des sensibilités apparentes nous amènent à des données quantitatives similaires. Vingt-cinq minutes après injection, on a une différence de moins de 9%. Ces éléments marquent la faisabilité de la méthode et devra être validé avec une statistique plus importante.

Néanmoins, un dernier point reste à prendre en considération à savoir l'hétérogénéité de la distribution du traceur dans l'hippocampe. Cet aspect va à présent être exposé ainsi que les méthodes qui seront mises en œuvre pour tenir compte de ce paramètre dans la perspective d'une meilleure quantification.

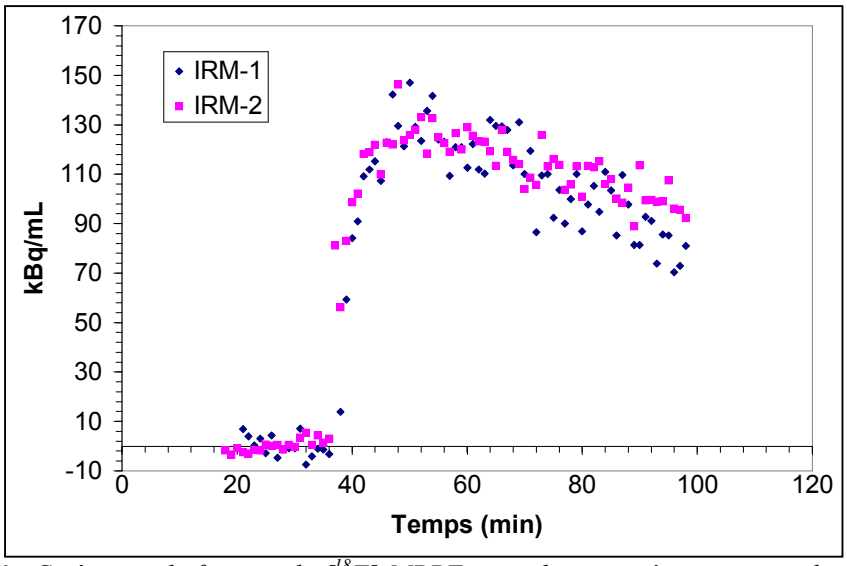


Figure IV. 16 : *Cinétiques de fixation du [^{18}F]-MPPF sous champ après correction des sensibilités apparentes obtenues à partir des coordonnées d'implantation stéréotaxique "réelles".*

III. 3 Optimisation de la quantification du [^{18}F]-MPPF *in vivo* basée sur la répartition des récepteurs 5-HT$_{1A}$ dans l'hippocampe

Jusqu'ici nous avons fait l'hypothèse que la concentration en radioactivité était homogène dans l'hippocampe. Cependant, la distribution des récepteurs 5-HT$_{1A}$ et donc du [^{18}F]-MPPF est préférentielle dans les régions CA1, CA2 et du gyrus denté de l'hippocampe [27]. Notre but est donc de prendre en compte cette information et de l'implémenter dans le β-Assistant. Dans ce cadre, une collaboration a été initiée avec T. Delzescaux et A. Dubois (SHFJ, CEA, Orsay) qui ont développés des outils de recalage et de reconstruction 3-D d'images autoradiographiques et des coupes anatomiques correspondantes, marquées au crésyl violet [29]. La figure IV. 17 présente les recalages réalisés pour une expérience préliminaire réalisée au CERMEP, où l'on peut voir les différentes zones de fixation du [^{18}F]-MPPF (injection d'une activité de 1.9 mCi dans un volume de 400 µl et prélèvement du cerveau 20 minutes après injection, au plateau de l'enregistrement) ainsi que l'intensité relative du marquage : on distingue nettement un signal intense dans tout le gyrus denté (dorsal et ventral) et dans la partie ventrale du CA1.

Il est possible que la prise en compte de cette répartition entraîne une réévaluation des concentrations du signal radioactif. La réalisation d'une gamme de radioactivité lors des prochaines expériences autoradiographiques nous permettra de connaître *ex vivo* la concentration exacte de traceur dans l'hippocampe et de comparer ces résultats à nos données *in vivo*.

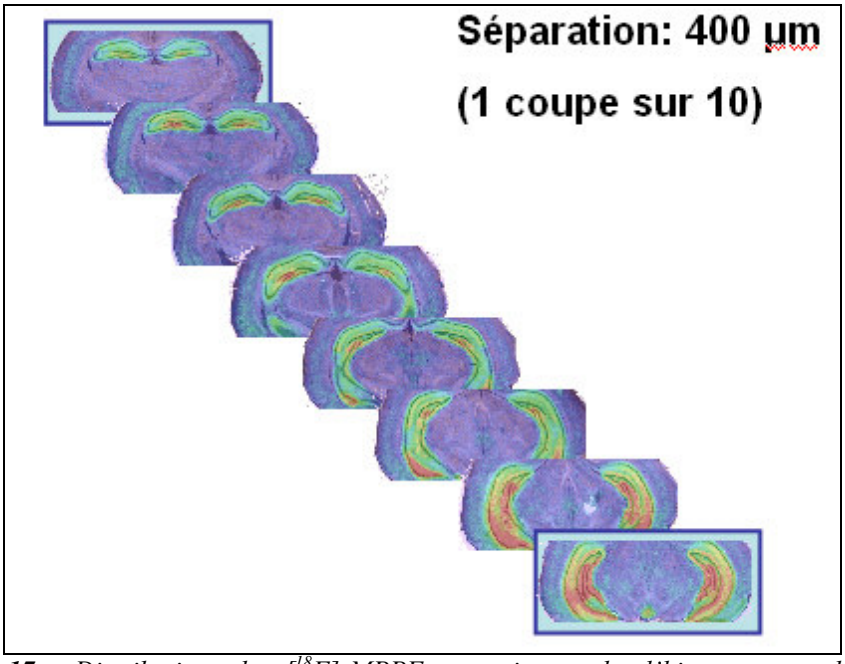


Figure IV. 17 : *Distribution du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe obtenue par autoradiographie et recalée sur coupes marquées au crésyl violet. En rouge sont représentées les zones de plus fortes activités, en vert de moyennes activités et en bleu de faibles activités.*

IV Conclusion et perspectives

Cette première partie nous a permis de confirmer la faisabilité du couplage simultané *in vivo* de la β-MicroProbe et de l'IRMa dans un contexte biologique. Au-delà de cette faisabilité, les images IRMa nous ont permis de connaître avec précision les coordonnées d'implantation des sondes et ainsi d'améliorer significativement la quantification absolue du signal radioactif issu de l'hippocampe à l'aide du fantôme de cerveau de rat voxelisé. De plus, ces images nous ont donné la possibilité de vérifier l'impact de l'implantation de la sonde dans les zones d'intérêt, présence d'un hématome ou d'un écoulement sanguin anormal par exemple.

Les méthodes développées pour la quantification du signal radioactif dans une structure cérébrale (fantôme voxelisé de cerveau de rat et volumes de détection pour différents diamètres de sondes et différents isotopes notamment) sont en fait incontournables pour les mesures effectuées *in vivo* dans des structures complexes, comme l'hippocampe, pour des structures de petites tailles, comme le raphé dorsal et pour des isotopes énergétiques, comme le ^{11}C ou l'^{15}O. Dans ce cadre, plusieurs études ont révélées une sous-estimation systématique des paramètres obtenus avec la β-MicroProbe par rapport aux données *ex vivo* [30-33]. L'hypothèse d'un effet de volume partiel, connu pour affecter les images TEP des structures dont les dimensions sont inférieures à deux fois la résolution du détecteur [34], a naturellement été évoquée pour justifier cette sous-estimation. Néanmoins, en l'absence de fantôme adéquat, aucune correction de la méthode de quantification n'a pu être proposée. Ainsi, l'utilisation d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat que nous avons développé offre une méthode de quantification des signaux provenant des différentes structures cérébrales compris dans le volume de détection et permettrait probablement d'expliquer cette sous-estimation du signal.

Enfin, les travaux que nous avons décrits ci-dessus ont clairement montré l'importance de prendre en compte les structures cérébrales incluses dans le VD pour une meilleure quantification chez le rat. Cette prise en compte est encore plus cruciale pour une quantification absolue du signal radioactif dans le cerveau de souris aux dimensions bien inférieures à celles du rat. Pour permettre une étude quantitative chez la souris, actrice incontournable des modèles animaux génétiquement modifiés, nous avons développé des méthodologies adaptées sur la base de nos travaux sur le rat (chapitre V).

Plus généralement, les méthodes de quantification exploitées en radioimagerie s'appuient, depuis plusieurs années, sur l'utilisation de fantômes de cerveau et de corps entier de rongeur, basés soit sur coupes histologiques 2-D [35, 36], soit sur des images IRM [37], soit sur des modèles analytiques d'organes utilisant de simples volumes comme des cylindres et des ellipsoïdes [38] ou des surfaces non uniformes [39]. Dans le domaine de l'imagerie nucléaire, ces fantômes ont été utilisés comme géométrie d'entrée réaliste pour les codes de simulation et ont prouvé leur intérêt pour les études dosimétriques [38], l'amélioration de l'instrumentation [40] ou l'évaluation des algorithmes de reconstruction [36]. Pour améliorer la capacité de quantification du microPET [41], Rubins et al [42] ont proposé une méthode de mesure utilisant le fantôme de cerveau de rat segmenté, développé par Toga et al [35]. Bien que très prometteuse, la conclusion de leur étude était liée à la nécessité d'inclure non seulement les plus larges structures comme le striatum, le cortex ou le cervelet mais aussi d'y ajouter de plus petites structures. Dans ce contexte, notre équipe a développé un cerveau de rat voxelisé, présenté dans ce document, incluant de petites

structures ainsi qu'un corps entier de rat voxelisé, présentant les principaux organes. Leurs implémentations dans le code Monte Carlo Geant4 (Fig. IV. 15) et l'amélioration du temps de calcul (par regroupement des voxels pour chaque structure et organe) a permis d'initier une collaboration avec S. Jan (SHFJ, CEA, Orsay) pour tester les algorithmes de reconstruction et l'analyse quantitative des mesures radioactives réalisées avec le microPET® FOCUS [43].

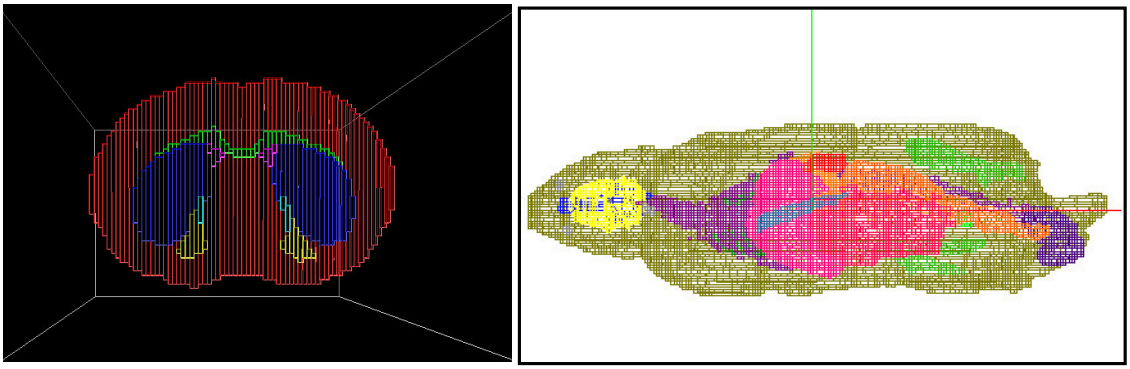


Figure IV.15 : *Cerveau de rat voxelisé (gauche) et corps entier de rat (droite) implémenté dans le code Monte Carlo Geant4.*

Références

[1] L. Zimmer, G. Mauger, D. Le Bars, G. Bonmarchand, A. Luxen, and J. Pujol. "Effect of endogeneous serotonin on the binding of the 5-HT_{1A} PET ligand ^{18}F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic Beta measurements combined with microdialysis" *Journal of Neurochem*, vol. 80, pp. 278-286, 2002.

[2] L. Zimmer, L. Rbah, F. Giacomelli, D. Le Bars, and B. Renaud. "A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT_{1A} PET ligand ^{18}F-MPPF binding in the rat hippocampus" *J Nucl Med*, vol. 44, pp. 1495-1501, 2003.

[3] L. Rbah, V. Leviel, and L. Zimmer. "Displacement of the PET ligand ^{18}F-MPPF by the electrically evoked serotonin release in the rat hippocampus" *Synapse*, vol. 49, pp. 239-245, 2003.

[4] P. Blier and C. De Montigny. "Current advances and trends in the treatment of depression" *Trends Pharmacol Sci*, vol. 15, pp. 220-226, 1994.

[5] E. Le Poul, N. Laaris, E. Doucet, A. Laporte, M. Hamon, and L. Lanfumey. "Early desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, vol. 352, pp. 141-148, 1995.

[6] J. Gardner, C. Fornal, and B. Jacobs. "Effects of sleep deprivation on serotoninergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of the freely moving cat." *Neuropsychopharmacology*, vol. 17, pp. 72-81, 1997.

[7] S. Hillver, L. Bjork, Y. Li, B. Svensson, S. Ross, N. Anden, and U. Hacksell. "(S)-5-Fluoro-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin: a putative 5-HT_{1A} receptor antagonist" *J Med Chem*, vol. 33, pp. 1541-1544, 1990.

[8] E. Seifritz, S. Stahl, and J. Gillin. "Human sleep EEG following the 5-HT_{1A} antagonist pindolol: possible disinhibition of the raphe neuron activity" *Brain Res*, vol. 759, pp. 84-91, 1997.

[9] A. Meneses and E. Hong. "Role of 5-HT_{1A} receptors in acquisition, consolidation and retrieval of learning" *CNS Drugs Rev*, vol. 3, pp. 68-82, 1997.

[10] R. Glennon. "Serotonin receptors: clinical implications" *Neurosci Behav Rev*, vol. 14, pp. 35-47, 1990.

[11] W. Kostowski, A. Plaznik, and T. Archer. "Possible implication of 5-HT_{1A} function for the etiology and treatment of depression" *New Trends Exp Clin Psychiatry*, vol. 5, pp. 91-116, 1989.

[12] S. Peroutka. "Serotonin receptor subtypes. Their evolution and clinical relevance" *CNS Drugs*, vol. 4, pp. 18-28, 1995.

[13] P. Saxena. "Serotonin receptors: subtypes, functional response and therapeutic relevance" *Pharmacol Ther*, vol. 66, pp. 339-368, 1995.

[14] J. Cryan and B. Leonard. "5-HT_{1A} and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response" *Hum Psychopharmaco Clin Exp*, vol. 15, pp. 113-115, 2000.

[15] H. Steinbusch. "Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals" *Neurosci*, vol. 6, pp. 557-618, 1981.

[16] C. Nemeroff and L. Owens. "Treatment of mood disorders" *Nat Neurosci*, vol. 5, pp. 1068-1070, 2002.

[17] V. Pike, C. Halldin, and H. Wikström. "4 radioligands for the study of brain 5-HT_{1A} receptors *in vivo*" *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 38, pp. 189-247, 2001.

[18] Z. Zhuang, M. Kung, and H. Kung. "Synthesis and evaluation of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl]piperazine (p-MPPI): a new iodinated 5-HT_{1A} ligand" *J Med Chem*, vol. 37, pp. 1406-1407, 1994.

[19] C. Shiue, G. Shiue, P. Mozley, M. Kung, Z. Zhuang, H. Kim, and H. Kung. "p-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT_{1A} receptors in humans" *Synapse*, vol. 25, pp. 147-154, 1997.

[20] D. Le Bars, C. Lemaire, N. Ginovart, A. Plenevaux, J. Aerts, C. Brihaye, W. Hassoun, V. Leviel, P. Mekhsian, D. Weissmann, J. Pujol, A. Luxen, and D. Comar. "High yield radiosynthesis and preliminary *in vivo* evaluation of p-[^{18}F]-MPPF, a fluoro analog of WAY 100635" *Nucl Med Biol*, vol. 25, pp. 343-350, 1998.

[21] D. Le Bars, G. Bonmarchand, J. Alvarez, C. Lemaire, and C. Mosdzianowski. "New automation of [^{18}F]-MPPF using a coincidence synthesizer" *J Labelled Cpd Radiopharm*, vol. 44, pp. S1045, 2001.

[22] N. Ginovart, W. Hassoun, D. Le Bars, D. Weissmann, and V. Leviel. "*In vivo* characterization of p-[^{18}F]-MPPF, a fluoro analog of WAY-100635 for visualization of 5-HT_{1A} receptors" *Synapse*, vol. 35, pp. 192-200, 2000.

[23] A. Plenevaux, D. Weissmann, J. Aerts, C. Lemaire, C. Brihaye, C. Degueldre, D. Le Bars, D. Comar, J. Pujol, and A. Luxen. "Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of (4-2'-methoxyphenyl)-1-[2'(N-2-pyridinyl)-p-[^{18}F]fluorobenzamido]-ethyl]piperazine, p-[^{18}F]-MPPF, a new serotonin 5-HT_{1A} antagonist for positron emission tomography: an *in vivo* study in rats" *J Neurochem*, vol. 75, pp. 803-811, 2000.

[24] L. Zimmer, M. Riad, L. Rbah, A. Belkacem-Kahlouli, D. Le Bars, B. Renaud, and L. Descarries. "Toward brain imaging of serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor internalization" *NeuroImage*, vol. 22, pp. 1421-1426, 2004.

[25] M. Riad, L. Zimmer, L. Rbah, K. Watkins, M. Hamon, and L. Descarries. "Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the *in vivo* binding of [^{18}F]-MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat" *J Neurosci*, vol. 24, pp. 5420-5426, 2004.

[26] G. Paxinos and C. Watson. "The rat brain in stereotaxic coordinates" *Academic Press*.

[27] A. Plenevaux, C. Lemaire, J. Aerts, G. Lacan, D. Rubins, W. Melega, C. Brihaye, C. Degueldre, S. Fuchs, E. Salmon, P. Maquet, S. Laureys, P. Damhaut, D. Weissmann, D. Le Bars, J. Pujol, and A. Luxen. "[^{18}F]*p*-MPPF: a radiolabeled antagonist for the study of 5-HT_{1A} receptors with PET" *Nucl Med Biol*, vol. 27, 2000.

[28] F. Pain. "Communication personnelle".

[29] J. Dauget, A. Dubois, A. Hérard, L. Besret, G. Bonvento, P. Hantraye, and T. Delzescaux. "Towards a routine analysis of anatomical and functional postmortem slices in 3D" *XXIInd International Conference on Quantification of Brain Function with PET-Amsterdam*, 2005.

[30] Zimmer L, Pain F, Mauger G, Plenevaux A, Le Bars D, Mastrippolito R, Pujol JF, Renaud B, and L. P. "The potential of the Beta-MICROPROBE, an intracerebral radiosensitive probe, to monitor the [18F]-MPPF binding in the rat dorsal raphe nucleus" *Eur J Nucl Med*, vol. 29, pp. 1237-1247, 2002.

[31] B. Weber, N. Spath, M. Wyss, D. Wild, C. Burger, R. Stanley, and A. Buck. "Quantitative cerebral blood flow measurements in the rat using a beta-probe and H2 15O" *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 23, pp. 1455-1460, 2003.

[32] N. Ginovart, W. Sun, A. Wilson, S. Houle, and S. Kapur. "Quantitative validation of an intracerebral B-sensitive microprobe system to determine in vivo drug-induced receptor occupancy using [11C]raclopride in rats" *Synapse*, vol. 52, pp. 89-99, 2004.

[33] G. Mauger, W. Saba, P. Hantraye, F. Dolle, C. Coulon, Y. Bramoullé, S. Chalon, and M. Grégoire. "Multiinjection approach for D_2 receptor binding quantification in living rats using [^{11}C]raclopride and the Beta-microprobe: crossvalidation with *in vitro* binding data" *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, pp. 1-11, 2005.

[34] E. Hoffman, S. Huang, and M. Phelps. "Quantification in positron emission tomography. 1. effects of object size" *J Comput Assist Tomo*, vol. 3, pp. 299-308, 1979.

[35] A. Toga, E. Santori, R. Hazani, and K. Ambach. "A 3D digital Map of Rat Brain" *Brain Res Bull*, vol. 38, pp. 77-85, 1995.

[36] D. Dougherty, I. Hsiao, W. Wang, and G. Gindi. "Computerized biological brain phantom for evaluation of PET and SPECT reconstruction" *IEEE TNS*, vol. 45, pp. 1238-1243, 1998.

[37] M. Dhenain, S. Ruffins, and R. Jacobs. "Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI" *Dev Biol*, vol. 232, pp. 458-470, 2001.

[38] M. Konijnenberg, M. Bijster, E. Krenning, and M. De Jong. "A stylized computational model of the rat for organ dosimetry in support of preclinical evaluations of peptide receptor

radionuclide therapy with (90)Y, (111)In, or (177)Lu" *J Nucl Med*, vol. 45, pp. 1260-1269, 2004.

[39] W. Segars, B. Tsui, E. Frey, G. Johnson, and S. Berr. "Development of a 4-D digital mouse phantom for molecular imaging research" *Mol Imaging Biol*, vol. 6, pp. 149-159, 2004.

[40] S. Meikle, S. Eberl, R. Fulton, M. Kassiou, and M. Fulham. "The influence of tomograph sensitivity on kinetic parameter estimation in positron emission tomography imaging studies of the rat brain" *Nucl Med Biol*, vol. 27, pp. 617-625, 2000.

[41] S. Cherry, Y. Shao, R. W. Silverman, A. Chatziioannou, K. Meadors, S. Siegel, A. Boutefnouchet, T. Farquhar, J. Young, W. F. Jones, D. Newport, C. Moyers, M. Andreaco, M. Paulus, D. Binkley, R. Nutt, and M. Phelps. "MicroPET: a high resolution PET scanner for imaging small animals" *IEEE TNS*, vol. 44, pp. 1161-1166, 1997.

[42] D. Rubins, W. Melega, G. Lacan, B. Way, A. Plenevaux, A. Luxen, and S. Cherry. "Development and evaluation of an automated atlas -based image analysis method for microPET studies of the rat brain" *NeuroImage*, vol. 20, pp. 2100-2118, 2003.

[43] S. Jan, A. Desbrée, F. Pain, D. Guez, C. Comtat, H. Gurden, S. Kerhoas, P. Lanièce, F. Lefebvre, R. Mastrippolito, and R. Trebossen. "Monte Carlo simulation of the microPET FOCUS system for small rodents imaging applications" *Abstract IEEE TNS-Porto Rico*, 2005.

Chapitre V

Mesure *in vivo* de ligands radiomarqués chez la souris avec la β-MicroProbe

En décembre 2003, l'annonce du décryptage à 95% du génome de la souris par un consortium international de chercheurs est apparue comme un événement dans la communauté scientifique. Non seulement, nous partageons 90% de nos gènes avec la souris, mais ce mammifère a un cycle de reproduction rapide et est relativement facile à élever dans les laboratoires de biologie [1, 2]. Ainsi, il est maintenant possible de réaliser des modifications du patrimoine génétique de ces souris, de façon à obtenir des modèles biologiques pertinents, pouvant reproduire une maladie humaine déterminée, soit : (i) par l'introduction d'un ou plusieurs gènes normaux ou anormaux permettant d'exprimer la maladie à étudier, on parle alors de souris "knock-in" ; (ii) soit par la suppression d'un gène permettant d'analyser les conséquences biologiques de cette perte, on parle alors de souris "knock-out". Certaines altérations du génome peuvent ainsi approcher le phénotype d'une maladie. Les modèles animaux transgéniques se retrouvent maintenant dans tous les domaines de la science biomédicale [3], incluant les neurosciences [4, 5], le comportement [6], la pharmacologie [7] ou la cancérologie [8]. La disponibilité des animaux transgéniques facilite également le développement de nouvelles techniques thérapeutiques. L'intérêt évident des études *in vivo* chez la souris entraîne par suite l'adaptation des techniques d'investigation aux dimensions réduites des structures (2 g pour le cerveau de rat contre 0.45 g pour la souris).

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'adapter la β-MicroProbe aux études chez la souris en utilisant notamment des sondes de 250 µm de diamètre. Pour simplifier la validation biologique, nous avons choisi de réitérer les travaux réalisés, comme pour le rat, sur l'étude des récepteurs 5-HT_{1A} à l'aide du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe et du cervelet, présenté au chapitre précédent. Ce projet mené en collaboration avec le CERMEP et la plateforme Animage présente également l'avantage d'être le premier investigué chez la souris.

Ce cinquième chapitre a pour ambition simple de montrer les tous premiers résultats obtenus avec la sonde chez la souris. Pour cela, nous nous attacherons dans un premier temps, à la caractérisation physique des sondes utilisées pour cette étude. Puis, après avoir décrit le protocole expérimental établi, nous présenterons les premières données obtenues *ex vivo* et *in vivo*. Enfin, nous exposerons les méthodologies que nous avons d'ores et déjà mises en place pour optimiser le positionnement des sondes dans les structures d'intérêt ainsi que pour quantifier la radioactivité issue des zones adjacentes à l'hippocampe de souris mais compris dans le VD, permettant à terme la détermination de la concentration en [^{18}F]-MPPF dans cette structure.

I Adaptation de la β-MicroProbe aux études chez la souris et caractérisation physique des sondes

L'évolution de la sonde du rat vers la souris est passée par la réduction de la taille des sondes dont le diamètre de 500 µm pour le rat est trop imposant lorsqu'il est rapporté aux dimensions cérébrales de la souris. Pour rendre cette implantation raisonnablement possible, une sonde de 250 µm de diamètre a été choisie. Ceci a supposé la fusion de sondes plastiques de faibles diamètres et a nécessité pour cela l'adaptation de la machine à fusionner des fibres, exploitée initialement pour des fibres de diamètre 1.0 mm et 500 µm. Ce travail est en effet rendu difficile en raison de la différence des fibres de 500 µm dont le diamètre est suffisant pour maintenir une certaine rigidité, les fibres de 250 µm présentant une grande flexibilité et une grande fragilité. Ainsi, il a fallu redéfinir les paramètres et pièces de la tête de fusion afin d'assurer lors de la fusion un maintien optimal et non destructif des fibres. La suite de ce travail a comporté une phase de caractérisation physique des sondes.

Cette étape de caractérisation des sondes de 250 µm passe par l'étude des différents paramètres déjà évoqués dans le chapitre III pour les sondes de 500 µm et 1.0 mm. Ainsi, nous allons à présent nous intéresser au VD, au rendement lumineux et à la sensibilité de sondes de 250 µm. Nous nous centrerons pour cela sur le ^{18}F puisque les expériences biologiques que nous avons choisi de réaliser s'appuient sur l'injection du [^{18}F]-MPPF

I. 1 Volume de détection des sondes de 250 µm

Dans un premier temps, nous avons reconstruit le VD selon la procédure indiquée dans le chapitre III (§II) en simulant une fibre de 250 µm de diamètre placée dans une source de ^{18}F dans des tissus cérébraux (Fig. V.1).

Selon l'approximation ellipsoïdale présenté au chapitre III §II. 2, les VD et VD_{90} ont été estimés à 29.9 µl et 1.5 µl respectivement. Ainsi, le volume contribuant concrètement au signal est assez faible. Au regard des dimensions des structures cérébrales de la souris, l'utilisation d'une sonde de 250 µm de diamètre et l'isotope ^{18}F sont évidemment les plus adaptés. Néanmoins, même dans ce cas de figure, le VD ne sera pas entièrement compris même dans les plus grosses structures comme l'hippocampe ou le striatum (Fig. V. 2).

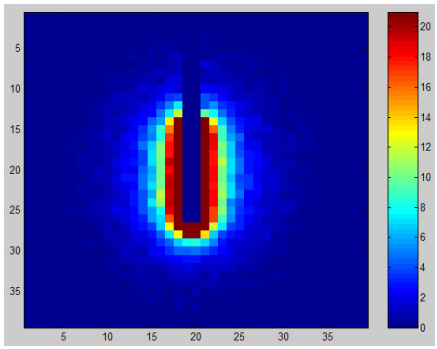


Figure V.1 : *VD pour une fibre de 250 µm de diamètre et 1.0 mm de longueur de scintillateur plongé dans du ^{18}F.*

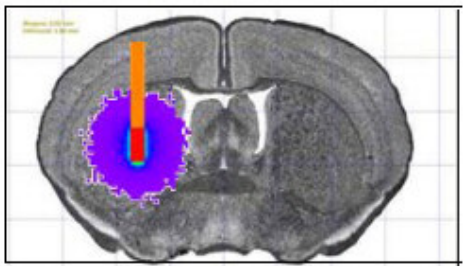


Figure V.2 : *Coupe frontale de cerveau de souris prélevée au niveau du striatum sur laquelle l'image d'une sonde de 250 µm a été simulée. La partie colorée correspond au VD de la sonde dans le cas d'une molécule marquée au ^{18}F.*

I. 2 Rendement lumineux et sensibilité de détection des sondes de 250 µm

Dans un second temps, nous avons déterminé expérimentalement la quantité de lumière produite pour une sonde de 250 µm de diamètre et l'impact de la fusion, plus complexe à réaliser que pour les sondes de 0.5 et 1.0 mm. Ces mesures ont été effectuées avec le dispositif en coïncidence présenté au chapitre III §IV. 2, permettant une analyse spectroscopique précise des faibles niveaux de lumière.

I. 2. 1 Quantité de lumière obtenue pour des fibres non fusionnées

La quantité de lumière résultant de l'irradiation par la source de ^{204}Tl a été déterminée pour différentes fibres non fusionnées de 0.25 mm de diamètre. La figure III.3 présente le spectre obtenu, moyenné sur un échantillon de quatre fibres et calibré en photoélectrons. Pour comparer ce spectre, ceux obtenus pour les fibres de 0.5 et 1.0 mm de diamètre sont également indiqués. Le nombre moyen et le nombre maximum de photoélectrons sont indiqués dans le tableau V.1. Le nombre maximum de photoélectrons est toujours défini comme le nombre photoélectronique ayant une intensité qui correspond à 1% de l'intensité maximale relative.

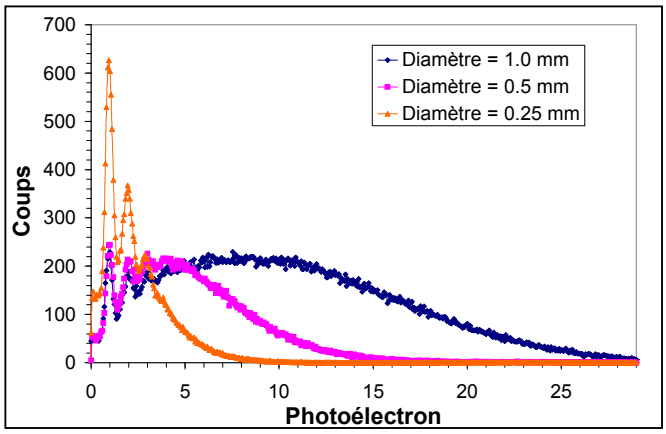


Figure V.3 : *Spectres photoélectroniques expérimentaux obtenus pour des fibres non fusionnées de 0.25, 0.5 et 1.0 mm de diamètre irradiées par une source de ^{204}Tl.*

	∅ 0.250 mm
Nombre moyen de photoélectrons	2.7 ± 0.4
Nombre maximum de photoélectrons	7.8 ± 0.9

Tableau V.1 : *Nombre moyen et maximum de photoélectrons obtenus expérimentalement pour des fibres non fusionnées de 0.25 mm de diamètre irradiées par une source de ^{204}Tl.*

Cette étude montre que la quantité de lumière générée par l'interaction d'un électron issu de la source de ^{204}Tl avec une fibre de 250 µm entraîne une réduction de moitié par rapport à une fibre de 0.5 mm de diamètre et une quantité de lumière quatre fois moins importante par rapport à une fibre de 1.0 mm. Cependant, le nombre moyen de photoélectrons reste supérieur au photoélectron permettant de pouvoir réaliser des mesures grâce à l'utilisation d'un PM adapté à la mesure de photons uniques. Par suite, nous avons pris en compte la fusion des fibres.

I. 2. 2 Quantité de lumière obtenue pour des fibres fusionnées

Pour évaluer l'influence de la fusion sur le niveau de lumière générée, différentes fibres fusionnées de 0.25 mm de diamètre et 2 mm de longueur de scintillateur ont été testées dans les mêmes conditions que citées précédemment. Le spectre obtenu ainsi que les spectres de fibres de 0.5 et 1.0 mm de diamètre sont présentés figure V.4, les différents paramètres caractérisant ce spectre étant indiqués tableau V.2.

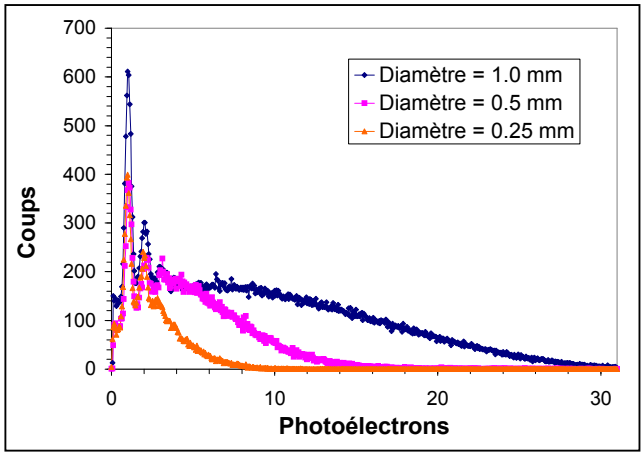


Figure V.4 : *Spectres photoélectroniques expérimentaux obtenus pour des fibres fusionnées de 0.25, 0.5 et 1.0 mm de diamètre et 2 mm de scintillateur irradiées par une source de ^{204}Tl.*

	∅ 0.250 mm
Nombre moyen de photoélectrons	2.6 (0.4)
Nombre maximum de photoélectrons	7.7 (0.9)

Tableau V.2 : *Nombre moyen et maximum de photoélectrons obtenus expérimentalement pour des fibres fusionnées de 0.25 mm de diamètre et 2 mm de scintillateur irradiées par une source de ^{204}Tl.*

On peut voir que la fusion des fibres de 250 µm ne change pas significativement en terme de photoélectrons. Ceci atteste une fois de plus de la qualité de la technique de fusion pour les fibres optiques plastiques même à ce diamètre.

Par la suite, nous avons déterminé la sensibilité de détection de la sonde, dans un premier temps, par simulation pour une fibre de 250 µm plongé dans une source cylindrique de ^{18}F dans les tissus cérébraux. Dans ce cas, nous obtenons une sensibilité de détection simulée de 0.109 cps/kBq/mL. Puis, l'évaluation de la sensibilité de détection expérimentale a été réalisée en plaçant des fibres de 250 µm de diamètre dans un bécher rempli d'une solution de ^{18}F. Sur la base de 7 fibres différentes, nous avons obtenu une sensibilité expérimentale de 0,040 ± 0.07 cps/kBq/mL. Cette mesure est donc bien inférieure à la mesure simulée, qui ne tient pas en compte les pertes optiques. Cette valeur, bien que faible, est restée cependant compatible avec les mesures chez la souris comme nous allons le voir dans la partie suivante.

II Etude cinétique de la fixation du [^{18}F]-MPPF chez la souris

Sur la base des résultats obtenus sur le plan physique, l'étape suivante a été dédiée à la validation biologique des sondes chez la souris. Pour cela, nous nous sommes appuyés, comme pour le couplage β-MicroProbe/RMN chez le rat anesthésié, sur les mesures pharmacologiques du [^{18}F]-MPPF, marqueur des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe (cf. chap.IV §I) en exploitant cette fois-ci un protocole d'implantation aiguë. Ce programme de travail a été initié en collaboration avec le CERMEP et la plateforme Animage de Lyon. Après avoir exposé le protocole expérimental finalement retenu, nous présenterons les premières mesures cinétiques du [^{18}F]-MPPF réalisées *in vivo* chez la souris.

I. 1 Protocole expérimental pour la mesure du [^{18}F]-MPPF chez la souris

Une première série d'études préliminaires a été réalisée avec le système β-MicroProbe d'Animage afin, de vérifier tout d'abord la tenue mécanique des fibres plastiques de 250 µm dans les tissus cérébraux et d'établir un protocole expérimental précis pour les mesures cinétiques du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe et le cervelet.

Ces études ont été menées avec deux sondes de 250 µm de diamètre, 1.0 mm de longueur de scintillateur et 7.0 mm de longueur au total, l'utilisation de sondes de longueur supérieure à 7.0 mm s'étant révélée trop souple et présentant une moins bonne tenue mécanique dans les tissus cérébraux. Les souris faisant l'objet de cette étude étaient des souris Swiss d'environ 30 g.

La première étape a consisté, comme pour toutes études avec la β-MicroProbe, à étalonner les sondes en les plongeant dans un bécher rempli d'une solution radioactive de ^{18}F et à évaluer leurs sensibilités de détection. Dans une seconde étape, le protocole suivant a été appliqué:

<u>Anesthésie :</u>

(i) Anesthésie par injection intra-péritonéale de 1,8g/kg d'uréthane (1,8g/10mL).

(ii) Rappel d'injection: correspondant à 20% de la dose initiale (si nécessaire).

Préparation stéréotaxique :

(i) Positionnement de la souris sur la couverture chauffante (Fig. V.5).
(ii) Placement des barres d'oreilles et du pince-museau maintenant la tête selon l'axe horizontal. Le pince-museau a été adapté pour les études chez la souris.

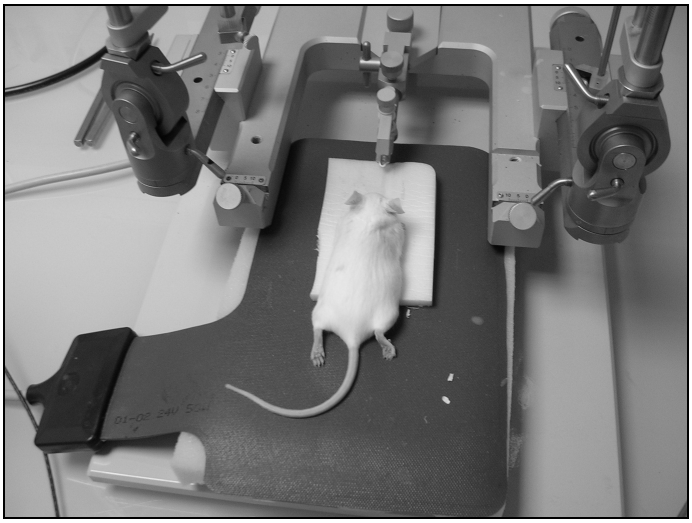


Figure V.5 : *Placement de la souris anesthésiée sur le cadre stéréotaxique avant implantation des sondes.*

Préparation de l'injection :

(i) Clampage de la queue pour faire ressortir la veine.
(ii) Placement d'un cathelon dans la veine caudale avec environ 20µl d'héparine pour fluidifier le sang (et éviter qu'il n'y ait des caillots lors de l'injection).

Stéréotaxie :

(i) Repérage du bregma (Br).
(ii) Détermination des coordonnées stéréotaxiques pour l'hippocampe et le cervelet (Fig. V.6).

Hippocampe :
AP : Br_{AP} **- 3.0**
ML : Br_{ML} **+ 3.0**
DV : Br_{DV} **- 3.8**

Cervelet :
AP : Br_{AP} **- 5.8**
ML : Br_{ML} **- 1.0**
DV : Br_{DV} **- 3.0**

(iii) Chirurgie crânienne.
(iv) Implantation des sondes, avec un angle de 20° pour la sonde cervelet en raison d'un encombrement stérique des sondes.

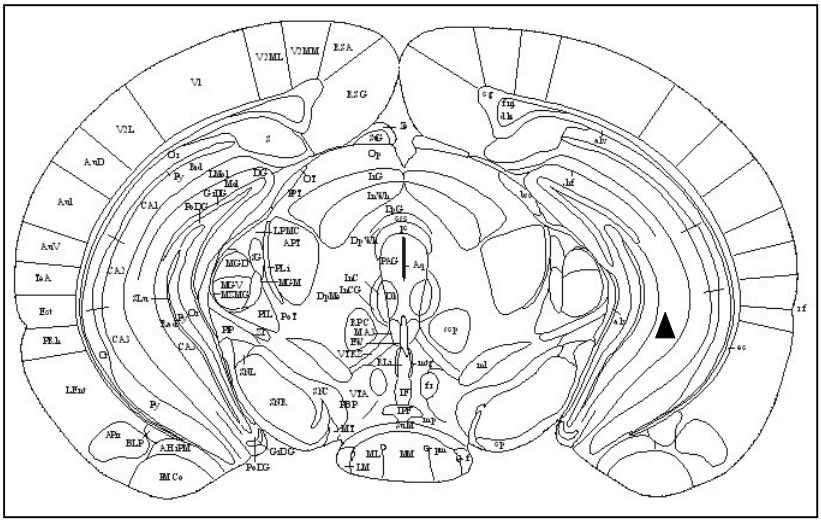


Figure V.6 : *Zone d'implantation stéréotaxique dans l'hippocampe repérée (triangle noir) à l'aide d'une coupe coronale de l'atlas de souris [9].*

Préparation de l'acquisition avec la β-MicroProbe :

(i) Placement des guides (60 cm).
(ii) Blindage des PM à l'aide de plombs entre la souris et les boîtiers.
(iii) Mise sous tension une fois l'expérience protégée de la lumière.
(iv) Mesure du bruit de fond pendant ¼ à ½ heure.

Injection :

(i) Injection du [^{18}F]-MPPF sur 30s : 600 µCi dans 300 µL (il reste toujours au moins 100 µCi dans la seringue).
(ii) Dégagement du volume mort avec 100 µL de sérum physiologique.
(iii) Vérification de l'activité restante dans la seringue.
(iv) Acquisition entre 1H et 1H30.

Vérification de l'implantation :

(i) Sacrifice de l'animal.
(ii) Prélèvement du cerveau.
(iii) Congélation du cerveau dans l'isopentane et refroidi à –80°.
(iv) Découpe au cryostat du tissu congelé puis dépôt avec vérification de l'implantation des sondes dans l'hippocampe ou dans le cervelet.

I. 2 Mesure du marquage spécifique du [^{18}F]-MPPF chez la souris

Dans un premier temps, nous avons réalisé une série de mesures *ex vivo* afin de comparer la distribution du [^{18}F]-MPPF chez la souris par rapport à celle du rat. Pour cela, des coupes autoradiographiques au niveau de l'hippocampe de souris ont été effectuées. La figure V. 7 présente une coupe coronale de cerveau de souris, après injection d'une activité de 100 µCi et prélèvement du cerveau 20 minutes post-injection. Cette image nous permet de vérifier

la fixation spécifique du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe comme cela a été observé précédemment chez le rat et montre l'intérêt du traceur pour les études des récepteurs 5-HT_{1A} chez la souris.

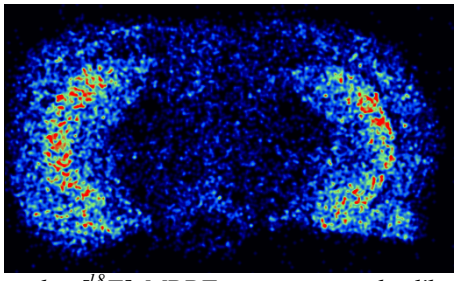


Figure V.7 : *Distribution du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe de souris obtenue par autoradiographie (injection de 100 µCi). En rouge sont représentées les zones de plus fortes activités, en vert de moyennes activités et en bleu de faibles activités.*

Sur la base de ces données *ex vivo* et du protocole précédemment décrit, deux expériences préliminaires ont été réalisées *in vivo* chez la souris. Les cinétiques d'accumulation du [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe et le cervelet de la souris anesthésiée ont été enregistrées et corrigées du bruit thermique des photodétecteurs, de la décroissance radioactive du ^{18}F et de la différence de sensibilité entre les deux sondes (la sonde hippocampe étant pris comme référence). Les cinétiques de fixation du [^{18}F]-MPPF (en cps) obtenues en soustrayant le marquage dans le cervelet (marquage non spécifique) de la cinétique d'accumulation dans l'hippocampe (marquage spécifique) sont présentées figure V.8. Les données sont moyennées toutes les minutes et normalisées à un temps donné du plateau (15 min après injection). Les courbes présentent un profil de cinétique similaire. Quelques secondes après l'injection, on observe l'arrivée du traceur dans les structures, où les sondes sont implantées. Le marquage spécifique est à son maximum entre 15 et 30 min après injection avant de décroître progressivement, décrivant un profil de cinétiques similaire à celui observé chez le rat. Ces expériences sont les premières réalisées, à notre connaissance, *in vivo* chez la souris à l'aide du [^{18}F]-MPPF, une statistique plus importante sera néanmoins nécessaire pour conclure.

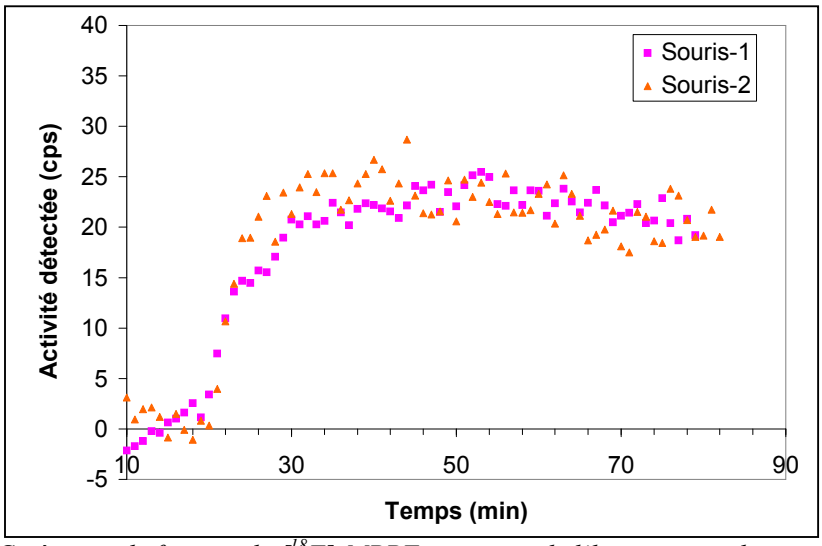


Figure V.8 : *Cinétiques de fixation du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe de souris.*

III Méthodologies pour la quantification du signal radioactif chez la souris

Comme évoqué précédemment, les dimensions réduites des structures cérébrales rendent d'autant plus cruciales le développement de méthodologies pour déterminer la concentration radioactive dans la zone d'intérêt et obtenir une quantification absolue. Dans ce cadre, nous avons développé de façon similaire au rat, un fantôme de cerveau de souris.

Le fantôme de souris réalisé est basé sur "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates" de Paxinos et Franklin [9] qui contient une centaine de coupes coronales détaillées de cerveau de souris. Les différentes coupes ont tout d'abord été recalées puis segmentées à l'aide du logiciel de traitement d'images Amira 3.1. Les coupes n'étant pas équidistances, une étape d'extrapolation a été nécessaire pour obtenir des coupes à intervalles réguliers de 100 µm (Fig. V.9). On obtient par suite une matrice 3-D comprenant 126 coupes (1517*1161*126) dont chaque voxel est un élément cubique de 100 µm de côté. 16 structures cérébrales ont ainsi été segmentées à savoir : le bulbe olfactif, le cervelet, le cortex supérieur, le cortex inférieur, le colliculus, le raphé, le noyau du raphé dorsal, les ventricules, l'hippocampe, le fornix, le corps calleux, le striatum, la capsule interne, le globus pallidus, l'aqueduct et le claustrum.

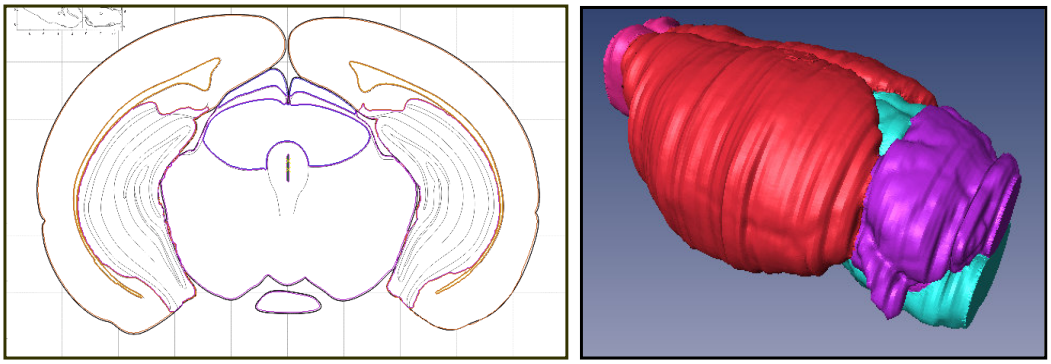


Figure V.9 : *Phase de segmentation du cerveau de souris (gauche) et représentation en 3-D du cerveau de souris obtenu (droite). On peut distinguer le bulbe olfactif en rose, le cervelet en violet et le cortex supérieur en rouge.*

La matrice de cerveau de rat a, par la suite, été implémentée dans le β-Assistant présenté dans le chapitre 4 §III. 1, adapté pour la souris. L'interface du β-Assistant-souris est présentée figure V. 10. Celui-ci permet d'évaluer, selon l'endroit d'implantation, le volume des structures compris dans le VD d'une sonde de 250 µm ainsi que l'efficacité associée. Il permet également d'optimiser la position d'implantation selon la structure étudiée. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux coordonnées d'implantations optimales pour l'hippocampe et le striatum par exemple (Tableau V.3).

	Dorso-ventral (en µm)	Antéro-postérieur (en µm)	Médio-latéral (en µm)	V_t Volume inclus dans le volume de détection (µl)	$E_i(\mathbf{r})$ Efficacité de détection apparente (%)
Hippocampe Droit	-3800	-3300	2900	7.26	2.95
Hippocampe Gauche	-3800	-3200	-2800	7.42	2.84
Striatum Droit	-3800	500	1800	9.64	2.41
Striatum Gauche	-3900	500	-1800	9.57	2.41

Tableau V.3 : *Coordonnées d'implantations optimale pour l'hippocampe droit, l'hippocampe gauche, le striatum gauche et le striatum droit.*

Dans notre cas, les coordonnées d'implantation dans l'hippocampe (DV : -3.0 mm, AP : -3.0 mm, ML : 3.0 mm), qui ont été déterminées selon la position optimale mais également selon l'encombrement stérique des sondes, nous donne un volume de 7.42 µl avec une efficacité apparente de 2.77%. Ainsi, on obtient une variation de seulement 4% entre la coordonnée d'implantation effective et la coordonnée d'implantation optimale déterminée par le β-Assistant-souris. Néanmoins, une variation dans l'implantation de seulement 200 µm dans le plan antéro-postérieur et médio-latéral entraîne jusqu'à 15% de perte par rapport à la coordonnée optimale.

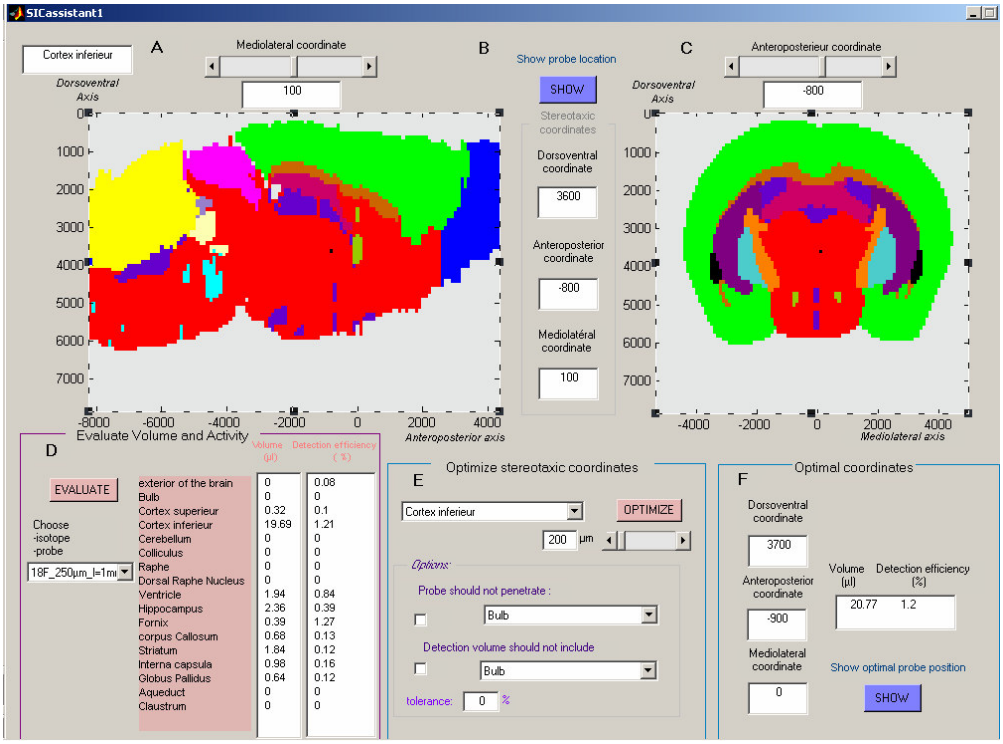


Figure V.10 : *Interface β-Assistant-souris.*

IV Conclusion et perspectives

Comme dans le cas du fantôme de rat, la prise en compte de l'hétérogénéité de la distribution du [^{18}F]-MPPF dans les tissus cérébraux devra être prise en compte pour évaluer la concentration en traceur dans l'hippocampe. Pour cela, des autoradiographies seront réalisées au niveau de l'hippocampe de souris en collaboration avec le CERMEP. Après une série d'expériences complémentaires obtenues avec la β-MicroProbe, les données *ex vivo* nous permettrons de comparer nos résultats *in vivo* afin de conclure sur la faisabilité de la méthode.

Afin d'affiner notre analyse, nous avons également réalisé un fantôme corps entier de souris. Celui-ci est basé sur des images IRMa (4.7 Tesla) de haute résolution spatiale en collaboration avec M. Dhenain du groupe de spectroscopie et d'imagerie *in vivo* du laboratoire de biophysique moléculaire de l'institut Curie d'Orsay. Le champ de vue de l'imageur étant trop petit pour prendre en considération tout le corps de la souris sans causer d'artéfacts, la première étape a consisté à fusionner, sous Amira 3.1, les deux matrices fournies par les images IRM. Après cette étape de recalage, le travail a alors été dédié à la segmentation des différents types de tissus (peau, os, tissus mous) et des organes principaux (cœur, poumons, reins, foie, estomac, …). La figure V. 11 présente les différentes étapes de ce travail depuis les images IRM jusqu'au résultat de la segmentation 3-D. A court terme, la segmentation obtenue sera codée sous forme de fichier d'entrée pour le code de simulation Geant4. Cette implémentation nous permettra de déterminer précisément la contribution du signal généré par l'interaction des gammas de 511 keV d'annihilation, qui constitue une source potentielle de signal parasite. Ainsi, à l'aide du fantôme de corps entier de souris, nous réaliserons des simulations Monte Carlo pour une sonde implantée dans le cerveau et déterminerons avec précision les contributions des gammas émis dans les différents organes de l'animal comme le cœur, les poumons, la vessie ou les yeux. Ces contributions devraient, comme pour le rat, s'avérer faible de par la nature même du matériau scintillant choisi et la distance entre les organes et la sonde.

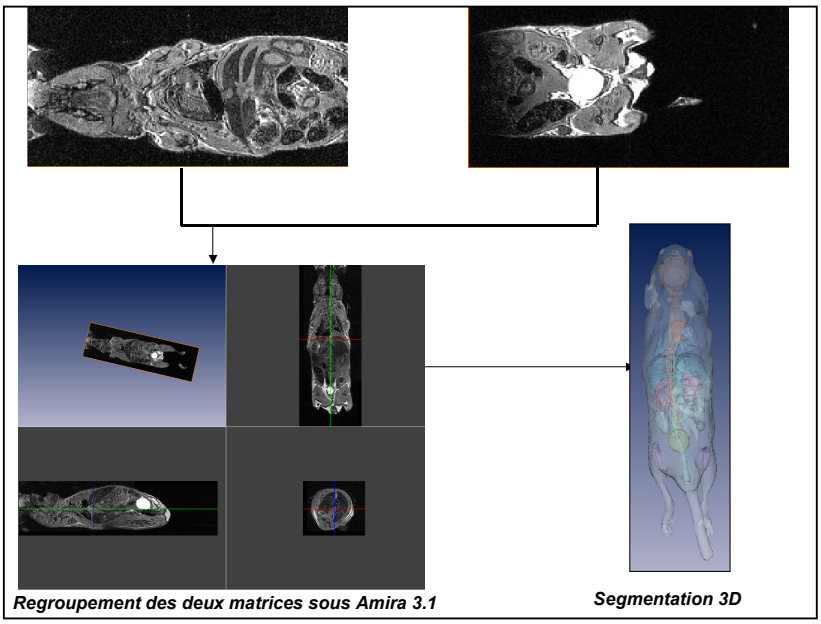


Figure V.11 : *Construction du fantôme de corps entier de souris depuis les images IRM (en haut), au recalage des images (en bas à gauche) jusqu'au résultat 3-D de la segmentation (en bas à droite).*

Références

[1] F. Foster. "A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice" *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 28, pp. 1165-1172, 2002.

[2] A. Chatziioannou. "Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs" *Eur J Nucl Med*, vol. 29, pp. 98-114, 2002.

[3] A. Bernstein and M. Breitman. "Genetic ablation in transgenic mice" *Molecular Biol Med*, vol. 6, pp. 523-530, 1989.

[4] X. Gao, A. Kemper, and B. Popko. "Advanced transgenic and gene-targeting approaches" *Neurochem Res*, vol. 24, pp. 1181-1188, 1999.

[5] R. Brusa. "Genetically modified mice in neuropharmacology" *Pharmacol Res*, vol. 39, pp. 405-419, 1999.

[6] J. Crawley. "Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests" *Brain Res*, vol. 835, pp. 18-26, 1999.

[7] U. Rudolph and H. Mohler. "Genetically modified animals in pharmacological research: future trends" *Eur J Pharmacol*, vol. 375, pp. 327-337, 1999.

[8] J. Viney. "Transgenic and gene knockout mice in cancer research" *Cancer Metast Rev*, vol. 14, pp. 77-90, 1995.

[9] G. Paxinos and K. Franklin. "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates" *Academic Press*.

Conclusion

Depuis une quinzaine d'années, un effort considérable a été entrepris dans le domaine de l'imagerie *in vivo* pour offrir aux biologistes et médecins un panel d'outils adaptés à l'analyse des processus physiologiques ou physiopathologiques chez le rongeur et les différents modèles s'y rapportant. Dans une première phase, les efforts ont été concentrés sur la mise au point de ces techniques pour une exploitation dissociée : des résolutions spatio-temporelles adéquates pour l'imagerie petit animal ont été atteintes, laissant en contrepartie des insuffisances quant aux différents types de signaux enregistrés sur le même animal (chapitre 1). Pour pallier cette insuffisance, les développements méthodologiques actuels portent sur le couplage de modalités d'imagerie mais se limitent, à quelques exceptions près, à des études théoriques. Dans ce cadre, la combinaison des techniques magnétiques et nucléaires reste un challenge des plus intéressants mais aussi des plus délicats à réaliser techniquement. Une alternative au TEP a été proposée et réalisée au sein de notre laboratoire sous la forme d'une sonde radiosensible (β-MicroProbe, chapitre 2) qui est couramment utilisée par plusieurs laboratoires de neurobiologie et qui est adaptable aux études sous champ magnétique (chapitre 3). Dans ce contexte, et pour la première fois à notre connaissance, nous avons proposé et réussi à coupler simultanément des enregistrements par la sonde radiosensible β-MicroProbe et les techniques RMN (chapitre 4).

Le travail présenté dans ce document a d'abord permis de valider la faisabilité d'un point de vue physique et biologique de ce couplage. D'un point de vue physique, les études théoriques, confirmées par des caractérisations expérimentales, ont montré que, bien que le volume de détection puisse être fortement réduit sous champ magnétique de 7-T, la sensibilité de détection n'était que faiblement réduite. Cette sensibilité de mesure est rendue possible grâce à une efficacité de détection proche de la fibre plus grande en présence de champ magnétique et un dépôt en énergie dans le scintillateur plus important entraînant une augmentation de la quantité de lumière émise.

La faisabilité biologique du couplage, réalisée en collaboration avec le CERMEP (Lyon) et la plateforme Animage (Lyon) a été effectuée sur la base d'études des récepteurs $5HT_{1A}$ à l'aide du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe et du cervelet simultanément aux acquisitions IRMa. Ce contexte neurophysiologique a constitué un cadre d'études particulièrement intéressant puisque les zones d'intérêt présentent un contraste marqué en IRMa et la structure de l'hippocampe qui n'est pas entièrement compris dans le volume de détection de la sonde offre un exemple privilégié pour la quantification absolue de la concentration en traceur dans cette région. Ainsi, les expériences menées ont montré la convergence des courbes cinétiques du [^{18}F]-MPPF réalisées hors champ et sous champ. Elles ont également soulignées l'importance des acquisitions IRMa pour repérer précisément l'implantation des sondes et ont permis, dans les deux expériences réalisées sous champ exposés dans le chapitre 4, de faire une première estimation de la concentration en [^{18}F]-MPPF dans l'hippocampe.

Ce document a donc permis de répondre à deux enjeux essentiels, à savoir : (i) obtenir simultanément des paramètres biologiques complémentaires, ici des acquisitions pharmacologiques et anatomiques; (ii) améliorer la quantification du signal radioactif dans une région d'intérêt, ici l'hippocampe, grâce aux outils développés sur la base d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat.

A l'issu de ce travail, deux types de perspectives ont été définis:

Celles à court terme qui s'inscrivent directement dans la finalité de ce travail. Celles-ci comprennent, d'une part, la fin des travaux de quantification développée avec la sonde pour prendre en compte l'hétérogénéité du marquage radioactif dans les tissus hippocampiques et aboutir à une quantification exacte. Pour cela, des autoradiographies seront réalisées au niveau de l'hippocampe et reconstruites en 3-D en collaboration avec l'équipe de T. Delzescaux de l'URA2210 du SHFJ d'Orsay. La répartition du traceur ainsi que la concentration *ex vivo* du [^{18}F]-MPPF seront alors déterminées. Elles comprennent, d'autre part, les séries d'expériences supplémentaires sous IRM nécessaires à l'obtention d'une statistique suffisante pour comparer nos résultats *in vivo* avec les données *ex vivo* et conclure sur la précision de notre méthode de quantification.

Celles à plus long terme qui ambitionnent d'exploiter le couplage dont nous venons de faire la démonstration pour répondre à de nouveaux axes d'investigation en biologie. En effet, la variété des études pharmacologiques ou fonctionnelles pouvant être menées avec la β-MicroProbe et la diversité des techniques RMN (IRMa, IRMf, SRM, IRM de diffusion) peut apporter un ensemble riche de paramètres biologiques *in vivo* simultané sur un même animal. Dans ce cadre, la variation du métabolisme énergétique cérébrale et la connaissance des bases cellulaires du couplage neuro-énergétique sont, comme nous l'avons précisées dans le chapitre 2, des voies de recherches fondamentales de la neurophysiologie. Ainsi, la mise en œuvre combinée des deux approches complémentaires chez le rat peut nous permettre d'évaluer, d'une part, l'activité de l'hexokinase par [^{18}F]-FDG en utilisant la β-MicroProbe et d'autre part, la vitesse du cycle de Krebs (succession de réactions chimiques aboutissant à la formation d'ATP) par le suivi indirect d'un intermédiaire de ce cycle par SRM localisé du [^{13}C]-glucose (des travaux similaires ont été réalisés en ce sens chez le singe de façon non simultanée[*]). Dans un premier temps, il s'agit de vérifier *in vivo* simultanément l'hypothèse selon laquelle l'activité de l'hexokinase est corrélée à la vitesse de formation de l'ATP et donc à la vitesse du cycle de Krebs. Dans un second temps, l'exploitation de la dualité magnétique/nucléaire pourrait être conduite chez des animaux traités de façon chronique par un inhibiteur du cycle de Krebs (acide 3-nitroprionique) afin d'observer si la même relation entre niveau d'activité de l'hexokinase et vitesse du cycle de Krebs peut être observée dans des conditions pathologiques mimant un déficit mitochondrial similaire à celui observé dans certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington. Cette étude nécessitera toutefois le développement d'antennes dédiées, compatibles avec les mesures SRM dans les structures cérébrales aussi petites que celles du rat. Des recherches sont actuellement menées en ce sens par le Laboratoire de RMN Méthodologie et Instrumentation en Biophysique de Lyon.

Dans ce cadre, pour améliorer la résolution spatiale et temporelle en RMN, de nouveaux aimants à hauts champs magnétiques sont également en cours de développement (cf. chap.I §I.3.2). Un exemple de ces développements est l'aimant de 17-T dédié au petit animal proposé par le projet Neurospin (Saint-Aubin, France). Dans ce cadre, nous avons simulé, par curiosité, le VD pour des mesures réalisées par une sonde de 500 µm de diamètre-1.0 mm de longueur de scintillateur dans du ^{18}F dans un champ de 17-T. La figure III. 1 en montre le résultat. Dans ce cas, aucun positon n'est détecté au-delà de 600 µm du

[*] Boumezbeur F, Besret L, Valette J, Gregoire MC, Delzescaux T, Maroy R, Vaufrey F, Gervais P, Hantraye P, Bloch G, Lebon V. "Glycolysis versus TCA cycle in the primate brain as measured by combining (18)F-FDG PET and (13)C-NMR" *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, sous presse.

centre de l'axe de la fibre donnant au VD un aspect très confiné. C'est pourquoi, dans ce régime, l'effet est particulièrement intéressant pour augmenter significativement la résolution au-delà des limites imposées par le parcours des positons.

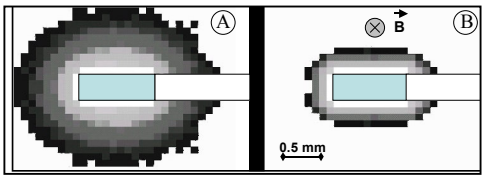


Figure III.1: *Volume de détection pour une fibre de 500 μm de diamètre dans du ^{18}F. (a) Volume de détection sans champ magnétique. (b) Volume de détection avec un champ magnétique de 17-T.*

Enfin, je terminerai en mentionnant que le chapitre 5 nous a permis de présenter les premières potentialités de la sonde pour les études *in vivo* chez la souris à l'aide de la β-MicroProbe. Les études réalisées dans le cadre de mesures pharmacocinétiques du [^{18}F]-MPPF au niveau de l'hippocampe et du cervelet ont montré des résultats prometteurs. D'autres expériences, menées selon le même protocole, permettront à très court terme de clore la validation des études chez la souris. Bien évidemment, l'utilisation de cette technique pourra par suite s'appliquer sur des modèles de souris génétiquement modifiées et pourra également s'orienter vers d'autres types de pathologies. Le développement effectif des méthodologies, basé sur les fantômes de cerveau et de corps entier de souris, et leur implémentation dans le code Geant4 nous permettra également d'affiner l'analyse et la quantification des signaux radioactifs enregistrés. Devant l'intérêt suscité dans la communauté de l'imagerie petits animaux, ces fantômes rats et souris seront mis à disposition via un site Internet actuellement en cours de construction au sein du groupe IPB.

Remerciements

Ces trois années furent riches d'expériences et de connaissances professionnelles et humaines. Mes pensées vont à tous ceux que j'ai rencontré tout au long de ce chemin.

Je remercie tout d'abord Mme Guillemaud-Mueller et Mr Berthier de m'avoir accueilli au sein de l'IPN d'Orsay ainsi que l'ensemble du personnel, notamment les services informatique, mécanique, administratif et mission qui m'ont facilité bien des fois ce travail de thèse.

Je suis très reconnaissante à Serge Goldman et Philippe Mangeot d'avoir accepté d'examiner mon mémoire en tant que rapporteurs et d'avoir manifesté leur intérêt pour mon travail. Je remercie également Philippe Hantraye et Christian Morel pour avoir accepté d'en être les examinateurs et Philippe Schwemling pour avoir accepté d'en être le président. Je tiens tout particulièrement à remercier Luc Valentin d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je remercie infiniment Philippe Lanièce d'avoir encadré ce travail de thèse. Ton expérience, ton enthousiasme permanent pour l'Interface, ton optimisme et ton soutien ont été précieux pour l'aboutissement de ce travail. Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je ne peux remercier Philippe sans remercier les membres de l'équipe "Neuro". Merci à Roland pour m'avoir proposé ce sujet passionnant, pour les nombreux conseils, discussions et critiques constructives que tu m'as prodiguées. Merci à Fred pour m'avoir initié aux joies des études avec la β-MicroProbe, des simulations Monte-Carlo et des fantômes voxelisés. Merci pour ta patience, ton aide et tes conseils qui ont été précieux tout au long de cette thèse. Merci à Hirac pour avoir entretenu mon intérêt pour la neurobiologie et pour m'avoir fait profiter de ta vision "bio" notamment pour les phases de corrections où tu as été d'une aide remarquable. Un grand merci aussi pour m'avoir accompagné à Lyon pour les manips d'autoradiographies. Vivement une nouvelle pizzeria à 22H quand il fait 30° à l'ombre ou un nouveau colloque de la Société des Neurosciences dans une ville dynamique!

Je remercie également chaleureusement chacun des membres du groupe IPB (actuel ou passé) pour tous les moments qui ont rendues ces 3 années si agréables : Anne-Lyse, Basile, Céciloo, Christiane, Christophe, Francky, Françoise, Jamila, Jérémy, Laurent, Lool, Lydie, Marie-Alix, Marine, Mathilde, Rainer, Robin, Stéphanie, Yves. L'ambiance n'aurait certainement pas été aussi bonne sans mes 2 "camarades thésards" Seb et Nidhal. Merci pour tous les bons moments que nous avons passés entre "djeuns" : des JJC, en passant par les soirées IPN, le mémorable caf'-info, la fête de la science, IEEE, les

conférences Népal, et tellement d'autres. Merci pour les moments de "taquineries" ou de réconfort. Seb, merci de m'avoir un peu laissé TON Burle et pour nos discussions hautement scientifiques sur MCNP versus Geant4, reproductibilité du nombre de photoélectrons par rapport aux simuls (mais où est passé ce facteur 0.8?) ou sur les très complexes méthodes de conversion! En tous cas, je vous souhaite sincèrement tout le meilleur pour la suite quel que soit le chemin que vous choisirez.

Les expériences biologiques n'auraient pu être réalisées sans la précieuse collaboration avec le CERMEP et la plateforme Animage. Je tiens tout particulièrement à remercier Luc Zimmer pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'a permis d'aborder un sujet des plus intéressants. Je remercie très chaleureusement Latifa sans qui les expériences de couplage ne seraient pas ce qu'elles sont. Merci d'avoir répondu avec patience et bonne humeur à mes nombreuses questions de "physicienne" sur le système sérotoninergique et d'avoir plusieurs fois fait passer nos manips avant les tiennes. Merci à Mathieu et Luc pour m'avoir permis de réaliser les manips souris, pour les conseils et leur sympathie. Je tiens également à remercier Emmanuel Chereul, Marc Janier et Jean-Baptiste pour nous avoir permis de réaliser les images IRM auprès du 7-T. Merci à tous les autres pour leur aide et leur accueil : Carole, David, Denis, Didier, Jamila, Marion, Nicolas, Véronique.

Ces 3 années à l'IPN ont été jalonnées de tant de sympathiques rencontres... Je tiens ici à remercier toutes les personnes rencontrées, notamment les thésards avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments : Adrien, Alexandre, Céline, Damien, Emilia, Julien (*2), Victor. Merci beaucoup Denis pour tes encouragements permanents et d'être venu de Chicago pour assister à ma soutenance. Merci aussi à Emilie et Laurent pour tous les petits moments de pause pendant la période de rédaction, notamment les soirs et les WE... Nous voilà finalement tous les 3 docteurs!

Un grand merci à mon "industriel" préféré, Mr Jacquemet et la société Luxeri, qui m'a souvent bien dépanné, toujours avec le sourire! C'est quand vous voulez pour de nouvelles fibres à conditionner...

Merci aussi à mon "enthousiaste" stagiaire Anthony qui a bien travaillé pendant ces 6 semaines et 3 jours...

Je souhaite également remercier Sébastien Jan, Albertine Dubois et Thierry Delzescaux du SHFJ ainsi que Marc Dhenain de l'Institut Curie d'Orsay pour les collaborations que nous avons initiées sur les fantômes voxelisés. J'espère que celles-ci continueront d'être fructueuses.

Merci à Yves de m'avoir accepté au sein du DEA CPM, qui fut également une année riche en évènements et en rencontres. Je souhaite bonne chance à tous mes "camarades de promo" pour la suite.

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont tant apporté pendant toutes ces années. Je pense à ceux de P7, Alex, Guillaume et Romain. J'espère qu'on restera proche encore de longues années. Merci aussi à Anne, Claudia, Damien, Delphine, Jean-Paul, Karl, Stéphane, Stéphie, Waely et Zora (qui fait désormais partie du petit groupe!).

Un immense merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser les études que j'avais choisies. Merci à ma soeur qui est toujours là pour moi, dans tous les moments, et qui me montre toujours la voie de la persévérance. Je n'aurais pas assez de mots pour vous remercier, vous et Jean-Laurent pour votre présence et votre soutien inconditionnel. Je vous dédie cette thèse.

Résumé

Depuis ces 15 dernières années, les modèles animaux qui miment les pathologies humaines sont devenus incontournables pour comprendre les mécanismes biologiques et les pathologies humaines ainsi que pour évaluer de nouvelles voies thérapeutiques. La volonté d'étudier ces modèles au cours du temps a stimulé le développement d'instruments dédiés aux études *in vivo* chez le petit animal. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, le grand défi actuel est de pouvoir coupler simultanément plusieurs de ces méthodes. Dans ce cadre, la combinaison des techniques magnétiques et radioactives reste un challenge des plus intéressants mais aussi des plus délicats à réaliser techniquement. C'est pourquoi nous proposons de coupler les techniques magnétiques à la sonde radiosensible β-MicroProbe développée dans le groupe IPB et qui s'est révélée être une alternative aux mesures TEP. Dans ce contexte, le travail de thèse a consisté à étudier la faisabilité de ce couplage d'un point de vue physique, par simulation et par des caractérisations expérimentales. Puis, la mise en place d'un protocole biologique a été effectuée sur la base d'études pharmacocinétiques. Les expériences menées ont montré la possibilité d'utiliser la sonde pour des mesures radioactives sous champ magnétique intense simultanément à l'acquisition d'images anatomiques. Parallèlement, nous avons cherché à améliorer la quantification du signal radioactif grâce à l'utilisation d'un fantôme voxelisé de cerveau de rat. Enfin, l'émergence des modèles transgéniques nous a conduit à reproduire des études pharmacocinétiques chez la souris et à développer des fantômes voxelisés de souris.

Abstract

Since the last 15 years, animal models that mimic human disorders have become ubiquitous participants to understand biological mechanisms and human disorders and to evaluate new therapeutic approaches. The necessity to study these models in the course of time has stimulated the development of instruments dedicated to *in vivo* small animal studies. To further understand physiopathological processes, the current challenge is to couple simultaneously several of these methods. Given this context, the combination of the magnetic and radioactive techniques remains an exciting challenge since it is still limited by strict technical constraints. Therefore we propose to couple the magnetic techniques with the radiosensitive Beta-MicroProbe, developed in the IPB group and which shown to be an elegant alternative to PET measurements. In this context, the thesis was dedicated to the study of the coupling feasibility from a physical point of view, by simulation and experimental characterizations. Then, the determination of a biological protocol was carried out on the basis of pharmacokinetic studies. The experiments have shown the possibility to use the probe for radioactive measurements under intense magnetic field simultaneously to anatomical images acquisitions. Simultaneously, we have sought to improve the quantification of the radioactive signal using a voxelized phantom of a rat brain. Finally, the emergence of transgenic models led us to reproduce pharmacokinetic studies for the mouse and to develop voxelized mouse phantoms.

Mots clés

Interfaces Physique Biologie; Imagerie du petit animal; Modélisation et radioquantification en neurobiologie; Détection *in vivo* de molécules radiomarquées; Simulations Monte Carlo Geant4; Multimodalité; Sonde beta-sensible; IRM; Etudes pharmacocinétiques.