Université Paris Descartes

École doctorale 563: Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (MTCI)

Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle (LVTS)-INSERM 1148

IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PHOSPHATIDYLSERINE DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

Par Khadija BENALI-ABDELLAOUI

Thèse de doctorat de Sciences du vivant et environnement

Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Imageries

Dirigée par Pr Dominique LE GULUDEC

Présentée et soutenue publiquement le 11/10/2019

Devant un jury composé de :

- Pr Catherine GHEZZI ..... Rapporteur
- Pr Alain MANRIQUE ..... Rapporteur
- Pr Pierre Yves MARIE ..... Examinateur
- Pr Bernard IUNG..... Examinateur
- Pr François ROUZET ..... Examinateur
- Pr Dominique LE GULUDEC ..... Directrice de thèse

A mes chers parents,
Merci pour votre amour, pour votre confiance, pour ce que je suis…

A mon adorable sœur et à mes neveux,
Merci d'être là, merci pour vos sourires et votre énergie positive

A mon amour Anis,
Merci de m'avoir suivie dans cette expérience, merci pour ta présence, merci pour ton amour et ta joie de vivre.

A mon Sélim
Mon chéri merci pour ta patience, merci pour ton soutien, merci d'être là, ton livre est enfin prêt. Je n'oublierai jamais ta phrase : Mais maman va écrire mon livre, je te promets d'être sage… Et tu n'as que cinq ans…

A mon Eliès,
Eh oui tu n'as que quelques mois, et pourtant, grâce à toi je me suis mise un ultimatum pour l'écriture de cette thèse. Tu as accompagné mon stress et ma joie pendant 9mois. Tes sourires et rires, toi et ton frère me chargent en énergie.

A mes beaux-parents,
Merci pour votre soutien.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier et à exprimer ma profonde gratitude et mon admiration au Pr Dominique Le Guludec qui a dirigé cette thèse. Elle m'a donné non seulement l'opportunité de travailler sur ce sujet passionnant, mais aussi elle a cru en moi et n'a cessé de me pousser vers l'avant, depuis le jour où elle m'a prise sous son aile et m'a acceptée dans son équipe. Elle ne cesse d'enrichir notre savoir dans tous les domaines. Mille mercis pour tout.

Je remercie le Pr François Rouzet pour son soutien, pour tout ce qu'il m'a appris ayant toujours cette capacité de simplifier les situations les plus compliquées. C'est vraiment un plaisir de continuer à travailler avec lui.

Je remercie les Prs. Alain Manrique et Catherine Ghezzi d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail, et dont les commentaires avisés m'ont permis d'en améliorer la qualité.

Je remercie le Pr Bernard Iung d'avoir accepté d'apporter son éclairage de cardiologue clinicien et de spécialiste de l'endocardite dans l'évaluation de ce travail.

Je remercie le Pr Pierre Yves Marie d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour son expertise dans le domaine de l'imagerie nucléaire.

Je souhaiterais exprimer ma reconnaissance aux Directeurs de l'équipe INSERM U1148, Mr Didier Letourneur, d'avoir accepté que je fasse partie de son équipe et le précédent Mr Jean-Baptiste Michel pour son savoir et qui a énormément contribué à ce travail.

Je remercie l'équipe du CIC, en particulier le Pr Xavier Duval, Emila Ilic-Habensus, Isabelle Gorenne, Valérie Vignali, Jean-Luc Ecobichon, le service de cardiologie du Pr Steg, et le Dr Cédric Laouénan, pour avoir aidé à la réalisation de ce travail.

Une pensée et un remerciement spécial pour mesdames Liliane Louedec, Anne Petiet, Rachida Aid et Nadège Anizan.

Je remercie Pr Laure Sarda-Mantel, pour m'avoir initié à l'activité de recherche et m'avoir fait profiter de son ample expérience sur l'annexine.

Je souhaiterais, aussi, témoigner ma reconnaissance envers Dr Arnaud Dieudonné, Dr Sébastien Leygnac, Milan Milliner, Dr Rana Benazzouna et Dr Jonathan Vigne.

Je remercie du fond du cœur, l'équipe de médecine nucléaire de l'hôpital Bichat. En effet, certains travaillent avec des collègues, j'ai eu pour ma part le bonheur de pouvoir travailler

avec des amis. Merci de m'avoir supportée pendant si longtemps, merci pour le soutien dans les moments plus difficiles, et pour la bonne humeur. Merci pour la bonne ambiance familiale, les fous rires et le sérieux. Merci Rénata Chequer, Samuel Burg, Fabien Hyafil, Besma Mahida, Nidaa Mikail, Eve Piekarski, Jérôme Slama, Warda Ferrag, François Scalbert, Souad Bani. Merci à l'équipe de manipulateurs, d'infirmières et de techniciennes Labo qui ont pu m'aider à assurer ce travail.

Un grand merci à une amie spéciale de longue date, une amie qui a su m'épauler durant la dernière ligne droite de cette thèse. Merci Haifa Ben cheikh.

Merci à l'équipe de médecine nucléaire de Sousse, en Tunisie. Ma soif de savoir, ma curiosité, l'amour de l'imagerie nucléaire sont nés là-bas et ont été et seront encore consolidés dans le pays qui m'a accueilli. Merci au Pr Essabbah, Pr Ajmi, Pr Guezguez, à mes collègues et amies Maha, Manel et Raja.

Liste des principales abréviations

^{99m}Tc: ^{99m}Technétium

^{18}F: Fluor 18

^{67}Ga: ^{67}Gallium

^{68}Ga: ^{68}Gallium

^{123}I: Iode 123

AAA: Advanced Accelerator Applications

AA: Acide Aminé

ADP: Adénosine diphosphate

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

AnxA5: Annexine A5

CIC: Centre d'Investigations Cliniques

CPP: Comité de Protection des Personnes

CRF: Case Report Form (cahier d'observation)

CSI: Comité de Surveillance Indépendant

DSMB: Data Safety Monitoring Board

EI: Endocardite infectieuse

EIG: Événement indésirable grave

EIGI: Effet Indésirable Grave Inattendu

ETO: Echographie trans-oesophagienne

FDG: Fluorodesoxyglucose

GMP: Good Manufacturing Practices (Bonnes pratiques de fabrication)

HYNIC: Hydrazinonicotinamide

ILT: Intra-Luminal Thrombus (Thrombus intra-luminal)

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

IRS: Informations de Référence sur la Sécurité

MBq: MégaBecquerel

MiCoE: Molecular Imaging Center of Excellence

mGy: milliGray

mSv: milliSievert

OCT: Tomographie par Cohérence Optique

RIA: Radio-ImmunoAnalyse

RBM: Recherche biomédicale

PC: Phosphatidylcholine

PE: Phosphatidyléthanolamine

PI: Phosphoinositides

PMP: Protéines microbicides

PS: Phosphatidylsérine

SM: Sphingomyéline

SNM: Society of Nuclear Medicine

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomograpy (Scintigraphie conventionnelle)

TA: Thrombus Atrial

TDM: Tomodensitométrie (scanner)

TEP: Tomographie par Emission de Positons

US: échographie Ultrasonore

VG : Ventricule gauche

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS 5

AVANT-PROPOS 10

CHAPITRE 1 : IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PHOSPHATIDYL SERINE 13

1. INTRODUCTION 13

2. LES DIFFERENTES MODALITES D'IMAGERIE MOLECULAIRE 15

2.1 IMAGERIE NUCLEAIRE 17

2.2 IMAGERIE OPTIQUE 19

2.3 IMAGERIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE 20

2.4 AUTRES 21

2.4.1 ECHOGRAPHIE (US) 21

2.4.2 TOMODENSITOMETRIE (TDM) 22

3. PHOSPHATIDYLSERINE 24

3.1 ROLE PHYSIOLOGIQUE 24

3.2 INDUCTEURS DE L'EXPOSITION DE LA PHOSPHATIDYLSERINE A LA SURFACE CELLULAIRE 26

3.2.1 ACTIVATION PLAQUETTAIRE 26

3.2.2 APOPTOSE CELLULAIRE 30

4. LES LIGANDS PEPTIDIQUES D'INTERET POUR LE CIBLAGE ET L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS 32

5. LES LIGANDS PROTEIQUES D'INTERET POUR LE CIBLAGE ET L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS 34

5.1 LACTADHERINE 34

5.2 ANNEXINE A5 (AnxA5) : 35

6. IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS PAR LES ANNEXINES 35

6.1 LES FAMILLES DES ANNEXINES (ANX) 35

6.1.1 DEFINITION ET NOMENCLATURE 36

6.1.2 SEQUENCE ET STRUCTURE TERTIAIRE 37

6.1.3 STRUCTURE DU SITE CALCIUM DES ANNEXINES 38

6.1.4 FLEXIBILITE ET CHANGEMENT DE CONFORMATION 38

6.1.5 LIAISON DES ANNEXINES AUX MEMBRANES CELLULAIRES: 39

6.2 AnxA5 39

6.2.1 STRUCTURE DE L' AnxA5 40

6.2.2 DEVELOPPEMENT DE L'AnxA5 COMME OUTIL DE DIAGNOSTIC 41

6.2.3 RADIOMARQUAGE DE L'AnxA5 42

6.3 UTILISATION DE L'ANXA5 RADIOMARQUEE DANS L'IMAGERIE DES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES 44

6.3.1 IMAGERIE DE L'APOPTOSE CELLULAIRE 44

6.3.2 IMAGERIE DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE ET DU THROMBUS 48

6.4 L'AnxA5-128 49

6.4.1 AVANTAGES DE ^{99m}TC-AnxA5-128 PAR COMPARAISON AUX FORMES PRECEDEMMENT UTILISEES DES ANNEXINES RADIOMARQUEES, EN PARTICULIER LA FORME ^{99m}TC-HYNIC-AnxA5 50

6.4.2 ANXA5-128 : LE PRINCIPE PHARMACEUTIQUE ACTIF (IPA) ET LA SUBSTANCE PHARMACEUTIQUE 52

CHAPITRE 2 : EVALUATION DE RADIOLIGAND DE LA PS DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES 54

1. OBJECTIFS 54

2. APPROCHE PEPTIDIQUE DE L'IMAGERIE DE LA PHOSPHATIDYL SERINE 54

2.1 LIGAND PEPTIDIQUE DE LA PS ET IMAGERIE TEP : ^{68}GA-P04087 55

2.2 VALIDATION PRE-CLINIQUE DE L'^{99M}TC-AnxA5-128 72

2.2.1 COMPARAISON AVEC L'^{99M}TC-HYNIC-AnxA5 72

2.2.2 VALIDATION FINALE DU KIT CLINIQUE 84

3. TRANSLATION CLINIQUE 86

3.1 JUSTIFICATION DE L'ESSAI - HYPOTHESES DE TRAVAIL : 86

3.1.1 ENDOCARDITE INFECTIEUSE (EI) 87

3.1.2 THROMBUS ATRIAL (TA) 90

3.2 OBJECTIFS DE L'ESSAI CLINIQUE 91

3.2.1 OBJECTIF PRINCIPAL 91

3.2.2 OBJECTIFS SECONDAIRES 91

3.3 ETAPES ADMINISTRATIVES DE LA MISE EN PLACE DE L'ESSAI 93

3.3.1 FINANCEMENT DE L'ETUDE : 93

3.3.2 AVIS DU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES (CPP) 93

3.3.3 AVIS DE L'AGENCE NATIONALE DE SECURITE DU MEDICAMENT 93

3.4 RESULTATS D'ETUDE DE LA TOLERANCE 94

4. CONCLUSION 128

PERSPECTIVES 129

1. SUITE DE L'ETUDE ANNIE 129

2. APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR L'AnxA5-128 DANS LES DISSECTIONS AORTIQUES : PHRC PAIDDA 129

2.1 CONTEXTE CLINIQUE 129

2.2 ETUDE PAIDDA : 130

3. APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR L'ANXA5-128 A L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL D'ORIGINE INDETERMINEE (IVASC) 130

3.1 CONTEXTE CLINIQUE 130

3.2 ETUDE ANNICA : ÉVALUATION DE LA SCINTIGRAPHIE AVEC ^{99m}TC- AnxA5-128 POUR L'IDENTIFICATION DES PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE COMPLIQUEES DANS LES ARTERES CAROTIDES . 131

BIBLIOGRAPHIE : 133

TRAVAUX ET PARTICIPATION AUX CONGRES DANS LE CADRE DE LA THEMATIQUE DE RECHERCHE 142

1. ARTICLES PUBLIES : 142

2. PRINCIPALES PRESENTATIONS SCIENTIFIQUES : 143

2.1 COMMUNICATIONS ORALES : 143

2.2 PRESENTATIONS AFFICHEES : 143

ANNEXES : 144

RESUME EN FRANCAIS 146

RESUME EN ANGLAIS 146

TABLE DES FIGURES :

FIGURE 1: ÉTAPES CLES IMPLIQUEES DANS UNE ETUDE D'IMAGERIE MOLECULAIRE 15
FIGURE 2: LA STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE 24
FIGURE 3: ASYMETRIE DE DISTRIBUTION DES PS : ETATS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE 25
FIGURE 4: STRUCTURE DE LA PS 26
FIGURE 5: ROLE DES ANNEXINES 36
FIGURE 6: STRUCTURE DES ANNEXINES 38
FIGURE 7: STRUCTURE DE L'ANNEXINE-A5 41
FIGURE 8: IMAGE PLANAIRE REPRESENTATIVE APRES INJECTION DE ^{99m}TC HYNIC-ANXA5 CHEZ DES RATS AVEC ALLOGREFFE CARDIAQUE 45
FIGURE 9: MODELE DE LA FAÇON DONT LE STADE LESIONNEL ET L'EFFICACITE PHAGOCYTAIRE POURRAIENT DETERMINER LES CONSEQUENCES DE L'APOPTOSE DES MACROPHAGES DANS L'ATHEROSCLEROSE..... 48
FIGURE 10: SITE DE LIAISON DU ^{99m}TC A L'ANXA5-128 50
FIGURE 11: COMPARAISON ENTRE LES RAPPORTS (R=T/B) DES DIFFERENTS TYPES D'ANNEXINES RADIOMARQUEES AU ^{99m} TC IN VIVO, SUR LES IMAGES TEMP/TDM. 84
FIGURE 12: COMPARAISON ENTRE LES RAPPORTS (R=T/B) DES DIFFERENTS TYPES D'ANNEXINES RADIOMARQUEES AU ^{99m} TC EN AUTORADIOGRAPHIE 85

TABLE DES TABLEAUX :

TABLEAU 1: LES PRINCIPAUX AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES PRINCIPALES MODALITES D'IMAGERIE MOLECULAIRE 16
TABLEAU 2: LES NOMS DES ANNEXINES D'APRES MORGAN & FERNANDEZ (1999) 37
TABLEAU 3: FONCTIONNALITES, AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES ISOTOPES ET DES RADIOPHARMACEUTIQUES MARQUES A L'ANNEXINE A5 43

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Le diagnostic des pathologies cardiaques par imagerie a longtemps reposé sur la seule échocardiographie, qui reste l'examen initial de choix pour l'étude de la morphologie et de la fonction du ventricule gauche (VG) en raison de sa polyvalence, sa mobilité, sa haute résolution spatio-temporelle et son faible coût. Cependant, de nouvelles techniques d'imagerie non invasives telles l'échocardiographie 3D, la tomodensitométrie (TDM) cardiaque, l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) cardiaque, la tomographie par émission de positon (TEP), la tomographie par émission mono photonique (TEMP) se développent rapidement et se profilent comme des outils diagnostiques complémentaires majeurs.

Notre équipe de recherche s'est intéressée à l'imagerie moléculaire du thrombus, impliquée dans diverses pathologies cardiovasculaires. En effet, les thrombi artériels intra-luminaux (ILT) adhérant aux valves cardiaques (végétations), à l'oreillette ou à la paroi des anévrysmes de l'aorte abdominale, partagent une physiopathologie commune dont témoigne la présence de plaquettes activées associées à une expression intense de phosphatidylsérine (PS) sur la couche luminale du thrombus. Ils ont également les mêmes complications : dégradation du tissu sous-jacent et risque embolique consécutif à la fragmentation du thrombus. La stratégie diagnostique, actuellement basée sur l'imagerie morphologique seule (principalement échographique), n'est pas satisfaisante car elle manque de sensibilité et ne permet pas de différencier un thrombus actif (activité biologique de renouvellement) d'un thrombus quiescent (cicatrisé). Il est par conséquent fortement souhaitable de développer une nouvelle approche non invasive capable de renseigner sur l'activité biologique de l'ILT, de le détecter ainsi que ses complications emboliques et ce, en un seul examen d'imagerie.

L'intérêt de l'imagerie de l'apoptose cellulaire a conduit au développement d'agents d'imagerie ciblant la PS (exprimés à la surface des cellules apoptotiques), en utilisant l'AnxA5 comme ligand, en particulier dans le but d'évaluer l'efficacité précoce des thérapies en oncologie. L'AnxA5 biotinylée ou conjuguée à un marqueur fluorescent a été utilisée dans des applications *in vitro*. Elle a ensuite été marquée au ^{99m}Tc pour la TEMP et au ^{18}F pour la TEP, à des nanoparticules magnétiques ou des liposomes contenant du Gadolinium pour l'IRM, et à des marqueurs fluorescents pour l'imagerie optique, avec des preuves de concept pré-cliniques.

Notre équipe a eu l'idée d'appliquer cette imagerie moléculaire de la PS à des modèles de pathologies cardiovasculaires (thrombus anévrysmal, endocardite.), en raison de la surexpression de la PS à la surface des plaquettes activées, en utilisant la ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5 comme agent d'imagerie avec des résultats prometteurs. Un industriel a développé parallèlement un nouveau variant de l'annexine recombinante humaine possédant un site de chélation endogène du ^{99m}Tc appelée AnxA5-128, tout en conservant son affinité à la PS. Un autre industriel a développé un peptide affin à la PS.

Cette thèse est donc constituée de :

1/ une présentation des études précliniques comportant deux volets :

A) l'évaluation d'un petit peptide, ligand de la PS (affinité de l'ordre de 10^{-8} M à la PS) et marqué avec un émetteur de positons le ^{68}Ga. L'avantage potentiel d'un tel traceur TEP est un contraste meilleur lié à la taille du peptide (clearance plasmatique plus rapide) ainsi que l'amélioration de la détectabilité liée à la technique TEP. Nous avons obtenu un excellent rendement de marquage >95%. Nous avons réalisé une étude préliminaire sur un modèle d'endocardite infectieuse chez le rat, en marquant le peptide par du ^{67}Ga (en raison de sa demi-vie >^{68}Gallium permettant la réalisation d'images tardives et des autoradiographies pour localiser les fixations. Une hyperfixation a été notée en autoradiographie correspondant à la végétation infectieuse induite. En revanche, aucun signal n'a été détecté sur les images scintigraphiques.

B) l'évaluation du kit GMP de l'AnxA5-128 et sa comparaison avec la HYNIC-AnxA5 sur les modèles d'endocardite infectieuse (EI) (imagerie de la PS sur plaquettes activées) et de myocardite auto-immune chez le rat (imagerie de la PS sur les cellules apoptotiques). Nous avons retrouvé : une clairance plasmatique plus rapide ; une biodistribution similaire (captation rénale légèrement diminuée) ; une fixation sur la cible équivalente avec un contraste légèrement amélioré avec le variant 128.

2/ Une présentation de l'étude clinique consistant à réaliser la translation

En raison du diagnostic parfois difficile de l'EI, de sa sévérité liée à son potentiel embolique, une imagerie fournissant une information moléculaire sur l'intensité de l'activité biologique des végétations endocarditiques et permettant également la détection des complications thrombo-emboliques, serait d'un intérêt clinique majeur. Notre projet a donc pour objectif principal l'évaluation des performances de la scintigraphie à la ^{99m}Tc-AnxA5-128 dans le diagnostic de l'EI, et dans la détection des localisations emboliques secondaires. Il est financé par l'appel d'offre Inserm-DHOS « Recherche clinique

translationnelle », et effectué en collaboration avec le CIC Bichat 007. Ce projet a été présenté au comité de protection des personnes (CPP) qui a émis un avis favorable, ainsi qu'à l'ANSM avec un dossier de médicament expérimental et une brochure d'investigateur à laquelle nous avons contribué. Après accord des autorités, nous avons effectué la mise en place de l'étude avec les différents acteurs participants (CIC, services cliniques investigateurs, laboratoires …). Les premiers résultats analysés sur les 10 patients avec suspicion d'EI, inclus dans la phase I de l'étude de tolérance sont prometteurs aussi bien sur le plan de la sécurité du radiotraceur que sur la sensibilité de détection du thrombus infecté. Le comité de surveillance indépendant a donné un avis favorable.

CHAPITRE 1 : IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PHOSPHATIDYL SERINE

1. INTRODUCTION

La définition de l'imagerie moléculaire telle que validée et approuvée par la Task Force du MICoE et par la SNM est la suivante : l'imagerie moléculaire est la visualisation, la caractérisation et la mesure d'un processus biologique au niveau moléculaire et cellulaire chez les humains et autres organismes vivants (*1*). L'une des caractéristiques de l'imagerie moléculaire est d'explorer une grande partie de la biologie au sein des organismes vivants sans avoir à en extraire les tissus ou les cellules pour réaliser des analyses fines comme c'est le cas à l'heure actuelle. Ceci permettrait d'étudier les processus simples et complexes sur des cellules résidant dans leur environnement habituel, en préservant l'ensemble des mécanismes de régulation auxquels elles sont soumises.

L'imagerie moléculaire inclut typiquement une imagerie bi ou tridimensionnelle et une quantification des phénomènes biologiques et/ou biochimiques en fonction du temps (*2*). Ce groupe définit les agents d'imagerie moléculaire comme 'sondes' utilisées pour visualiser, caractériser et mesurer un processus biologique dans des systèmes vivants. Des molécules endogènes ou des sondes exogènes peuvent être des agents d'imagerie moléculaire.

Les techniques de visualisation incluent l'imagerie nucléaire, l'IRM, la spectrométrie par résonnance magnétique, l'imagerie optique, l'échographie, etc. Ces outils sont capables de visualiser et de quantifier dans l'espace et en fonction du temps des signaux émis par les agents d'imagerie moléculaire. Cette quantification permet une détermination de la concentration régionale de l'agent de l'imagerie moléculaire et des paramètres biologiques.

En clinique, l'imagerie moléculaire intervient dans la chaine de la prise en charge du patient, en mettant en évidence les processus biologiques impliqués dans la maladie, en personnalisant la prise en charge par une caractérisation d'un processus spécifique de la maladie, et en contribuant à la découverte et au développement du médicament, par exemple en étudiant sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamique.

L'imagerie moléculaire offre une approche personnalisée d'évaluation et de prise en charge des maladies cardiovasculaires, comme les lésions ischémiques, l'infarctus du myocarde, la thrombose, l'athérosclérose, les plaques vulnérables, l'angiogénèse et le rejet

de greffe.

Elle permet la caractérisation des propriétés tumorales ou des processus biologiques. Elle joue un rôle pivot dans la prise en charge des patients souffrant de cancer : diagnostic, stadification (extension et localisation), identification des cibles thérapeutiques, suivi voire prédiction de l'effet thérapeutique ainsi que l'évaluation pronostique.

Enfin, l'imagerie moléculaire joue un rôle important dans le diagnostic précoce, l'évaluation et le suivi de patients avec une pathologie neurologique.

Plus récemment, les données d'imagerie moléculaire ont été intégrées dans les recommandations de prise en charge de patient souffrant de pathologie infectieuse de type endocardite. Sa place dans la prise en charge des pathologies inflammatoires vasculaires gagne également progressivement du terrain.

La figure 1 résume les étapes clés impliquées dans le développement d'un agent d'imagerie moléculaire.

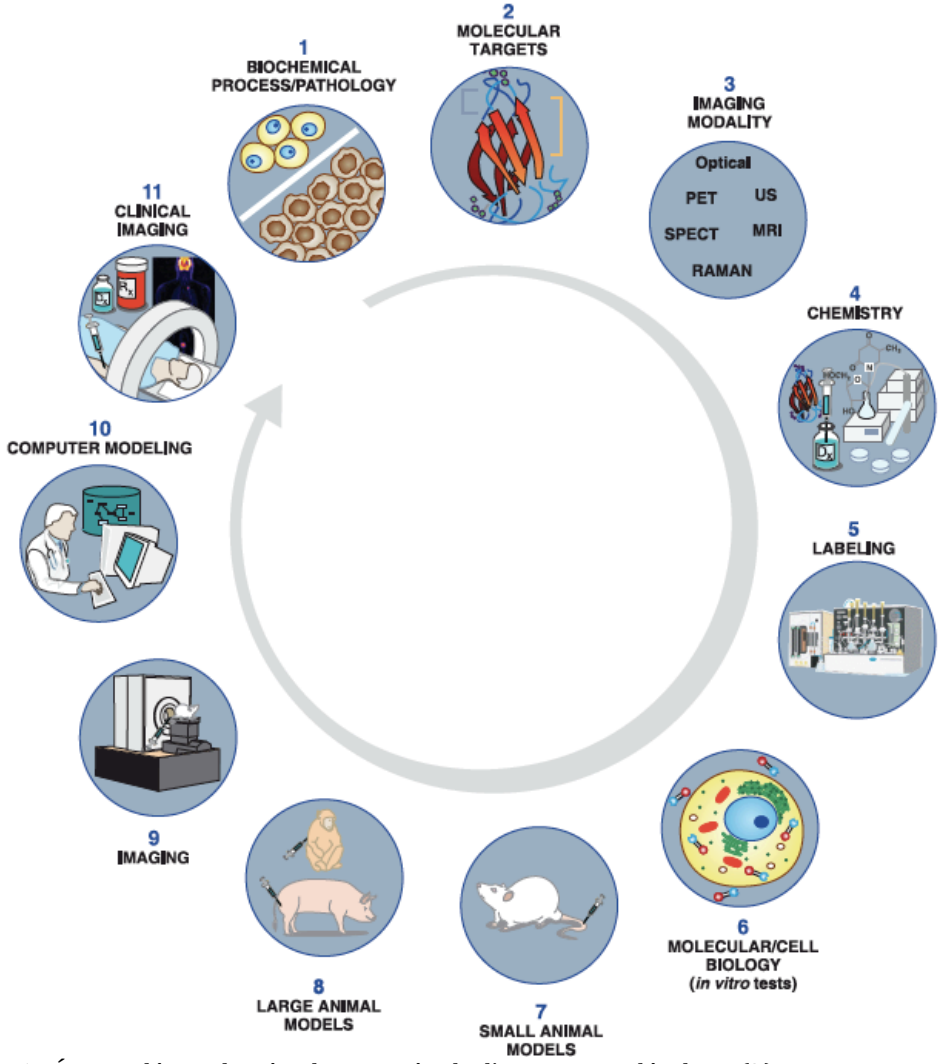


Figure 1 : Étapes clés impliquées dans une étude d'imagerie moléculaire (3)

La première étape consiste à identifier un processus biochimique ou une pathologie d'intérêt, et à évaluer la signification de la visualisation non-invasive de ce processus / pathologie via les outils de l'imagerie moléculaire. La deuxième étape consiste à décider d'une cible moléculaire : cela permettra une visualisation directe ou indirecte des phénomènes d'intérêt. Ceci est généralement suivi d'une sélection d'une modalité d'imagerie appropriée (comme celles discutées dans le chapitre 2) et, si nécessaire, un agent d'imagerie. Typiquement, une chimie appropriée et un marquage spécifique à la modalité d'imagerie choisie sont nécessaires pour synthétiser l'agent d'imagerie (il comporte donc à la fois un composant de ciblage et un composant de signalisation). Un certain nombre de tests in vivo et in vitro sont nécessaires pour évaluer la spécificité et pour sélectionner la méthode d'imagerie afin de visualiser au mieux les phénomènes d'intérêt.

2. LES DIFFERENTES MODALITES D'IMAGERIE MOLECULAIRE

Le champ de l'imagerie moléculaire est hautement multidisciplinaire, incluant plusieurs acteurs scientifiques : la biologie moléculaire, la biochimie, la physiologie, la physique, l'ingénierie, les mathématiques, la chimie, la pharmacologie, l'immunologie et la médecine.

Il y a plusieurs facteurs que le chercheur ou le clinicien va prendre en considération avant le choix de la ou des modalités, nous citons : la résolution spatiale, la sensibilité, la

résolution temporelle, l'imagerie corps entier, la résolution temporelle, la profondeur de pénétration, la portée des systèmes de détection (invasifs/non invasifs), l'exposition aux radiations, et l'analyse quantitative.

Nous discutons ici les principaux avantages et inconvénients des principales modalités d'imagerie moléculaire : médecine nucléaire, TDM, IRM, imagerie optique et échographie (US) dans le tableau 1.

Tableau 1: Les principaux avantages et inconvénients des principales modalités d'imagerie moléculaire (3)

	Résolution temporelle	**Résolution spatiale**	**Pénétration**	**Sensibilité**
TDM	Minutes	50-200µm (préclinique) 0,5-1mm (clinique)	Pas de limitation	ND
IRM	Minutes/heures	5–100µm (préclinique) 1 mm (clinique)	Pas de limitation	10^{-2} -10^{-5}M
PET	Secondes/ Minutes	1–2 mm (préclinique) 5–7 mm (clinique)	Pas de limitation	10^{-11} -10^{-12}M
TEMP	Minutes	1–2 mm (préclinique) 8–10 mm (clinique)	Pas de limitation	10^{-10} -10^{-11}M
US	Secondes/Minutes	0,01-0,1mm en superficie (quelques mm en profondeur) applications 1-2mm pour la profondeur (quelques cm de profondeur)	mm-cm	Excellent quand utilisation de micro bulles (10^{-12} M)
Imagerie optique par fluorescence	Secondes/Minutes	2-3mm	<1cm	10^{-9} -10^{-12} M
Imagerie optique par bioluminescence	Secondes/Minutes	3-5mm	1-2cm	10^{-15} -10^{-17} M

2.1 IMAGERIE NUCLEAIRE

L'imagerie moléculaire chez les sujets vivants a un lien très étroit avec la médecine nucléaire. Depuis son avènement, la médecine nucléaire avait pour objectif de faciliter le diagnostic et la prise en charge non invasive des patients via des radionucléides (libres ou liés à une molécule vectrice). La détection du signal en médecine nucléaire se fait par une gamma caméra ou une TEP en fonction du rayonnement émis. Cette gamma caméra a, elle-même, été modifiée pour avoir un système de détection rotatoire utilisé en conjonction avec des algorithmes de reconstruction et des calculs ; afin de générer des images tomographiques. Le premier TEMP système a été développé et implémenté par John Keyes en 1976.

La radioactivité est ainsi détectée dans le corps et sa distribution est déterminée par l'imagerie obtenue grâce à la caméra. Le système de détection est différent en fonction de la modalité : détection en coïncidence pour l'imagerie TEP et détection par un système de rotation autour du sujet pour l'imagerie TEMP.

Concernant l'imagerie médicale, étant donné que le changement métabolique et biochimique précède le changement anatomique, les TEP et TEMP ont un réel avantage diagnostic par rapport à la technique d'imagerie anatomique comme la TDM et l'IRM. Cependant, ils ont un inconvénient majeur, à savoir l'absence de référentiel anatomique.

Cette lacune a été corrigée en combinant ces instruments avec la TDM ou IRM, produisant des caméras hybrides. Cette approche appelée «multimodalité», combinant deux types de modalités, permet donc de compenser les faiblesses de chacune d'entre elles tout en exploitant les forces individuelles.

Une autre limitation des techniques d'imagerie par radionucléides est due au fait que ce sont des modalités utilisant des rayonnements ionisants, ayant de ce fait un impact dosimétrique.

Pour le public, l'exposition maximale est de 1 mSv (millisieverts) par an, alors que les travailleurs sous rayonnement peuvent être exposés jusqu'à 50 mSv au cours de la même période.

Les points forts de la TEP comprennent son excellente sensibilité (10^{-11}-10^{-12} M), sa profondeur de pénétration sans limite et sa capacité de quantification.

Bien que les techniques d'imagerie moléculaire soient des techniques relativement coûteuses et de résolution spatiale moindre en comparaison avec l'IRM, elles sont extrêmement flexibles en termes de types d'agents d'imagerie pouvant être utilisés pour lier des cibles moléculaires spécifiques. L'imagerie simultanée de plusieurs cibles différentes

("Multiplexage") n'est pas encore possible avec la TEP car les isotopes, qui sont des émetteurs de positrons, entraînent la production de deux rayons gamma avec des énergies de 511 KeV. Par contre, la TEMP a des capacités de multiplexage dues à une utilisation de nucléides donnant lieu à des rayons gamma de différentes énergies. Ceci est avantageux lorsque l'on souhaite imager plusieurs cibles biochimiques simultanément.

Les autres avantages du TEMP (comme la TEP) sont sa grande sensibilité (10^{-10}-10^{-11} M) et une profondeur de pénétration illimitée. Bien que la TEMP soit moins chère et plus largement disponible que la TEP, elle est généralement moins sensible et a une résolution spatiale moindre (8–10 mm, comparée à 5–7 mm observée avec TEP clinique) (*4*).

En outre, la TEP fournit la possibilité de correction de l'atténuation permettant une quantification du signal, ce qui n'est pas toujours complètement validé avec l'imagerie TEMP (*5*,*6*).

Contrairement aux techniques d'IRM, la TEP et la TEMP ne nécessitent que de petites quantités en masse d'agent d'imagerie à base de radionucléides (de l'ordre du nanogramme au milligramme) ; de ce fait elles sont généralement non toxiques et ont peu de chances d'exercer une action pharmacologique.

En recherche pré-clinique, l'utilisation de ces moyens d'imagerie est possible grâce à la commercialisation de systèmes d'imagerie TEMP et TEP dédiés au petit animal. La μTEMP offre un certain nombre d'avantages sur la μTEP dans les modèles de pathologies cardiovasculaires chez le petit animal : une résolution spatiale supérieure (<1 mm, alors que sur les systèmes cliniques c'est l'inverse), la disponibilité d'une multitude de radiotraceurs à demi-vie plus longue, la capacité de détecter plusieurs isotopes simultanément (et donc plusieurs traceurs), la simplicité de préparation des radiopharmaceutiques émetteurs gamma (en particulier en raison de la disponibilité permanente de ^{99m}Tc dans les services de Médecine Nucléaire) par rapport à la radiochimie parfois complexe de certains traceurs utilisés en TEP, nécessitant dans certains cas un cyclotron sur place, ainsi que la disponibilité de nombreux radiotraceurs cliniques pouvant être utilisés chez le petit animal, et enfin le coût en moyenne inférieur à celui de la TEP.

La μTEP offre une meilleure sensibilité permettant une imagerie dynamique, une correction d'atténuation largement validée, et une quantification absolue du signal. Le manque de résolution spatiale est dû au libre parcours du positon avant annihilation
(1 à 3 mm) et à l'écart angulaire par rapport à 180° de l'émission des photons d'annihilation.

2.2 IMAGERIE OPTIQUE

L'imagerie moléculaire s'appuie désormais également sur des méthodes optiques, qui consistent à injecter une molécule dotée d'un marqueur fluorescent et à suivre son devenir dans les cellules.

Les techniques d'imagerie optique sont sensibles et donc bien adaptées pour détecter une faible concentration de molécules cibles dans les tissus. Les systèmes de rapporteurs optiques tels que les colorants fluorescents ou les protéines 'rapporteurs' bioluminescentes ou fluorescentes sont des molécules stables et peuvent être facilement ciblées pour signaler des processus moléculaires spécifiques *in vivo*. Ainsi, l'imagerie optique peut s'appuyer sur une multitude d'outils développés pour la microscopie optique. En outre, les techniques sont relativement peu coûteuses, ce qui facilite leur diffusion dans la communauté de la recherche biomédicale. Les systèmes d'imagerie par fluorescence fournissent une excellente résolution spatiale et temporelle *ex vivo*, une bonne sensibilité, et possèdent une chimie favorable au développement d'agents d'imagerie moléculaire (*7*). L'approche optique est particulièrement adaptée à l'étude des processus biologiques *ex vivo.* Cependant, en raison de leur résolution spatiale relativement faible pour l'imagerie *in vivo*, les techniques optiques ne sont pas adaptées à l'imagerie des structures anatomiques. Ainsi des appareils hybrides incorporant, outre l'imagerie par fluorescence, une modalité TDM ou IRM pour le repérage anatomique sont de plus en plus utilisés (*8*). Récemment, une nouvelle approche a été développée permettant une imagerie optique 3D. La tomographie par fluorescence (FMT) enregistre les photons qui se sont propagés à travers les tissus selon des projections multiples et combine ces mesures pour déterminer la distribution des fluorochromes dans les tissus profonds. Lorsqu'une source ponctuelle éclaire les tissus, le champ de photons se propage et excite les fluorochromes selon leur distribution. Ceux-ci se comportent comme des sources secondaires émettant à une fréquence inférieure avec une intensité qui dépend de leur position par rapport à la source. Les informations de fluorescence sont collectées par une caméra, et corrigées de l'atténuation dans les tissus en utilisant une acquisition de la source d'excitation dans la même projection. Cette correction d'atténuation est associée à une correction de la diffusion des photons dans les tissus, ce qui permet d'obtenir une quantification absolue de la concentration du traceur.

L'imagerie par bioluminescence, qui emploie des sondes naturelles (telles que la luciférase) permet la visualisation de l'expression génique et de processus physiologiques à l'échelle moléculaire dans des tissus vivants (*9*). Cette approche est capable de détecter des

niveaux de lumière très faibles car il n'existe pas de bruit de fond. L'utilisant de sondes bioluminescentes, comme dans le cas où des cellules sont marquées par la luciférase, permet la détection de l'expression de gènes dans des cellules vivantes.

Pour surmonter le problème de la faible pénétration de la lumière dans les tissus, des approches reposant sur l'utilisation d'un cathéter ont été développées. La tomographie par cohérence optique (OCT) est une technique utilisant le proche infrarouge (longueur d'onde ≈ 1300 nm) pour la visualisation en coupe de la paroi vasculaire à haute résolution (4 à 16 μm) et avec une pénétration de 2 à 3 mm (*10*). L'OCT a été utilisée pour l'imagerie intra-vasculaire et la caractérisation précise de l'architecture des plaques d'athérome. L'utilisation de sondes fluorescentes émettant dans la gamme de l'infrarouge peut permettre l'imagerie moléculaire *in vivo* de la paroi vasculaire avec un système de détection de fluorescence intégré à un cathéter. De telles sondes dont le spectre d'absorption se situerait dans la gamme du spectre d'émission de l'OCT pourraient permettre d'améliorer la caractérisation des plaques d'athérosclérose (*11*).

2.3 IMAGERIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE

La technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basée sur le phénomène de la résonance magnétique nucléaire des noyaux d'atomes d'hydrogène – les protons – présents dans les molécules d'eau. Ces protons sont munis d'un moment magnétique (le spin) qui peut occuper deux positions, et qui, en présence du champ magnétique d'un aimant, correspondent à des énergies distantes de ΔE. L'application d'une onde de radiofréquence d'énergie ΔE permet de modifier les états énergétiques des spins. Lors de la coupure de l'onde de radiofréquence, les spins retournent dans leur état fondamental en restituant de l'énergie sous la forme d'un signal IRM. Ce signal, dit de résonance magnétique nucléaire, dépend de la concentration locale en protons et des relaxations longitudinales et transverses T1, T2 des protons contenus dans les tissus imagés. Ce scénario fournit la possibilité de développer des agents de contraste qui modifient les propriétés magnétiques de cet environnement aboutissant à un renforcement positif (T1, signal positif) ou négatif (T2, signal négatif).

Un autre progrès important dans l'IRM a été le développement d'agents de contraste IRM ciblés (complexes Gd ciblés ou SPIO) pour visualiser les marqueurs moléculaires et leurs événements biochimiques associés. Certains exemples spécifiques d'agents de contraste IRM ciblés et de leurs applications dans l'imagerie moléculaire comprennent : les nanoparticules SPIO fonctionnalisées avec des peptides spécifiques pour la détection

d'événements précoces d'athérosclérose (*12*), l'imagerie de gliome utilisant des SPIO fonctionnalisés avec des peptides spécifiques pour la métalloprotéinase-2 (*13*) et l'imagerie des intégrines αvβ3 en utilisant des liposomes contenant du Gd (*14*).

L'IRM a un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres modalités d'imagerie : 1) pas besoin de rayonnement ionisant; 2) profondeur de pénétration illimitée; 3) résolution spatiale élevée (clinique: ~ 1 mm comparé à 5-7 mm pour le PET, préclinique : micromètres, par opposition à la résolution millimétrique réalisable par imagerie optique et radionucléide ; 4) excellent contraste des tissus mous, supérieur à celui réalisable avec CT; 5) collecte simultanée de données physiologiques ou métaboliques (en utilisant, par exemple, l'IRM DCE et la spectrométrie par résonance magnétique, respectivement) avec des images anatomiques de haute résolution et même des informations moléculaires lorsqu'elles sont utilisées conjointement avec des agents d'imagerie ciblés compatibles avec l'IRM.

2.4 AUTRES

2.4.1 ECHOGRAPHIE (US)

Cette modalité d'imagerie médicale se base sur l'étude des propriétés et le comportement des ondes sonores à hautes fréquences dans le tissu biologique (1-20MHz). La résolution de l'échographie est améliorée avec les hautes fréquences mais aux dépens de la profondeur de pénétration (longueur d'onde diminuée, plus d'interactions sur le trajet et donc de l'atténuation, diminution de la distance de traversée). Donc le choix dépend des données voulues. L'imageur doit trouver un compromis entre la profondeur de pénétration et la résolution.

Les agents de contraste des US sont conçus pour modifier la réflexion ou la réfraction des ondes ultrasonores afin de rehausser le ratio du signal sur bruit avoisinant (*15*,*16*). Ces produits de contraste sont sous forme de microbulles (de l'ordre du micromètre de diamètre), contenant des gaz et recouverts de lipides ou de biopolymères.

Pour l'imagerie moléculaire, la surface des microbulles est modifiée de manière à présenter des ligands qui vont provoquer la liaison des microbulles à des épitopes présents sur la surface cellulaire, spécifiques de processus pathologiques. Leur liaison à leur cible engendre un contraste persistant durant l'examen échographique. Nous donnons comme exemple le ciblage des molécules d'adhésion leucocytaire pouvant être utilisées pour identifier la mémoire ischémique myocardique (*17*), l'angiogénèse (*18*), et le rejet aigu de greffe (*19*).

2.4.2 Tomodensitométrie (TDM)

La plupart des industriels ont, maintenant, intégré un scanner X haute résolution à d'autres systèmes d'imagerie à haute sensibilité de manière à obtenir des systèmes d'imagerie hybride dédiés à l'imagerie moléculaire chez le petit animal et chez l'homme. L'introduction de ces systèmes hybrides, dans un premier temps pour l'imagerie du petit animal (μTEMP/TDM et μTEP/TDM), a permis d'améliorer de façon importante les performances et la précision de l'imagerie nucléaire. La composante TDM est utilisée pour le repérage anatomique, ainsi que pour la correction d'atténuation et potentiellement de l'effet de volume partiel, qui constituent les limites de l'imagerie nucléaire. Des appareils hybrides du même type ont également été développés pour une utilisation clinique et sont rapidement devenus la norme. Ces appareils hybrides vont faciliter la translation de l'imagerie moléculaire vers les soins du patient. Certaines études suggèrent que le scanner seul pourrait également avoir un rôle dans l'imagerie ciblée vasculaire.

Certains avantages de la TDM incluent son temps d'acquisition rapide, sa résolution spatiale élevée (préclinique = 0.05-0.2 mm, clinique = 0.5-1.0 mm), sa disponibilité, et sa simplicité relative. La profondeur de la pénétration est sans objet avec cette modalité compte tenu de l'énergie relativement élevée des rayons X et de leur capacité à pénétrer dans le corps.

L'une des principales limites de la TDM est l'exposition élevée aux rayonnements, ce qui limite souvent le nombre d'acquisitions qui peuvent être effectuées chez le même patient dans un intervalle de temps donné. Il est important de noter, cependant, que les progrès de la sensibilité des détecteurs de rayons X réalisés au cours des 5 dernières années permettront à l'avenir des réductions significatives de la dose. Bien que la maturité de ces technologies ne soit pas encore suffisante pour une translation clinique généralisée, elles sont actuellement employées dans des systèmes précliniques pour petits animaux.

Une autre limite est le faible contraste entre les tissus mous en comparaison avec l'IRM, ce qui nécessite l'utilisation d'agents de contraste iodés pour permettre une discrimination plus précise entre les régions normales et les régions pathologiques (*20*). Ces agents de contraste à base d'iode simple, bien qu'utiles, sont généralement non spécifiques et ne fournissent donc pas d'informations sur des cibles biologiques spécifiques (*21*). De plus, dans la clinique, les agents de contraste peuvent provoquer des effets secondaires (en raison de la toxicité rénale) et ne peuvent être administrés à tous les patients.

Utilisation de la TDM en imagerie moléculaire :

La transformation de la TDM en une modalité capable de fournir des informations biochimiques est non triviale en raison de la faible sensibilité des agents de contraste compatibles avec la TDM. Par conséquent, la principale limite de la TDM dans les applications d'imagerie moléculaire est la masse de l'agent d'imagerie qui doit être injectée afin d'atteindre suffisamment le (s) site (s) cible (s) pour une modification de l'atténuation des rayons X. Cependant, de multiples exemples d'imagerie moléculaire utilisant la TDM commencent à apparaître. Hyafil et al. (*22*) ont rapporté l'utilisation de nanoparticules iodées pour l'imagerie cellulaire d'infiltration de macrophages dans les plaques d'athérosclérose chez des lapins utilisant un scanner multi-coupes. En outre, un certain nombre de groupes de recherche ont récemment signalé l'utilisation de nanoparticules d'or ciblées (connues pour induire une forte atténuation des rayons X) pour l'imagerie cellulaire et moléculaire dans la pathologie cancéreuse (*21*, *23*). Par exemple, un groupe a rapporté la synthèse et l'évaluation de nanoparticules d'or compatibles avec la CT fonctionnalisées avec des aptamères d'ARN spécifiques de l'antigène de la prostate (PSMA) (*24*). Les résultats ont démontré une absorption quadruple plus élevée de nanoparticules d'or conjuguées au PSMA-aptamer dans les cellules LnCaP (adénocarcinome de la prostate humaine) qui surexpriment la PSMA par rapport aux cellules PC3 (autre type d'épithélium prostatique) dépourvues de PSMA. En outre, un médicament thérapeutique contre le cancer de la prostate (Doxorubicine) a été chargé dans les nanoparticules ciblées, et il a été démontré que ces dernières étaient significativement plus efficaces contre les cellules LnCaP par rapport aux cellules PC3 témoins négatives. Bien que les résultats de ces études préliminaires d'imagerie moléculaire soient prometteurs, d'autres travaux sont nécessaires pour explorer les possibilités d'imagerie moléculaire de la TDM et de ses applications.

Dans l'ensemble, la TDM est une modalité d'imagerie clinique et préclinique largement disponible. Bien que les capacités d'imagerie moléculaire de cette technique ne soient pas encore pleinement explorées, elle reste un outil morphologique extrêmement utile. Lorsqu'elle est combinée avec les modalités TEP, TEMP, optique ou IRM, la TDM fournit un cadre de référence anatomique pour les résultats biochimiques et physiologiques obtenus par ces autres instruments d'imagerie.

3. PHOSPHATIDYLSERINE

3.1 ROLE PHYSIOLOGIQUE

Les membranes plasmiques sont constituées de molécules en proportions variables selon le type cellulaire (globalement 50 % de lipides, 45 % de protéines et 5 % de glycanes), et sont organisées en bicouche. Les deux feuillets de la membrane des cellules au repos présentent une asymétrie de répartition de leurs phospholipides. Parmi ceux-ci, la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont localisées principalement dans le feuillet externe ou exoplasmique, où se trouve aussi la plus grande proportion du cholestérol membranaire. En revanche, la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE) et les phosphoinositides (PI) sont majoritairement présents dans le feuillet interne ou endoplasmique.

Cet agencement est associé à une dynamique moléculaire qui accorde une mobilité de diffusion aux protéines et aux phospholipides selon le modèle de "mosaïque fluide", initialement décrit en 1972 par Singer et Nicholson (figure 2). Si les mouvements latéraux des phospholipides sont rapides, leurs échanges spontanés entre les deux feuillets de la membrane plasmique, ou "flip-flop", sont très lents (demi-vie de plusieurs heures), ce qui contribue à maintenir leur répartition asymétrique au sein de la membrane des cellules au repos.

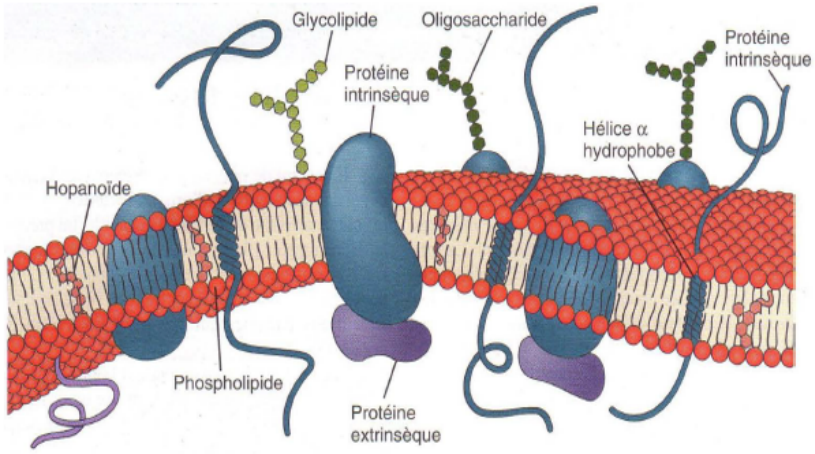


Figure 2: La structure de la membrane plasmique. 'Source Principe de biochimie' Horton et al. 2004

Cette figure montre le modèle de la membrane en mosaïque fluide où les protéines de structure flottent dans une double couche lipidique. Les protéines extrinsèques ou périphériques sont faiblement liées à la surface membranaire. Les extrémités hydrophiles des phospholipides sont représentées par de petites boules et les chaines d'acides gras hydrophobes par un trait ondulé. D'autres lipides tels que les hopanoïdes peuvent être présents. Pour la clarté du schéma, les phospholipides sont proportionnellement plus grands que dans une membrane réelle.

Cette asymétrie est régulée par l'activité conjointe de 3 transporteurs : A) la translocase ATP-dépendante, spécifique des aminophospholipides qui transporte rapidement les PS et les PE du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique ; B) la floppase ATP-dépendante qui transporte lentement tous les lipides du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane ; 3) la scramblase Ca2+ dépendante qui permet aux lipides de se mouvoir entre 2 feuillets dans les deux sens. Les translocases sont des cibles pour le Ca2+ qui régule directement les activités des transporteurs. A concentration physiologique de Ca2+, l'asymétrie des PS est maintenue parce que la translocase et la floppase sont actives tandis que la scramblase est inactive. Une concentration intra cellulaire élevée de Ca2+ induit une externalisation des PS à travers la membrane plasmique due à la stimulation de la scramblase et l'inhibition de la translocase (figure 3).

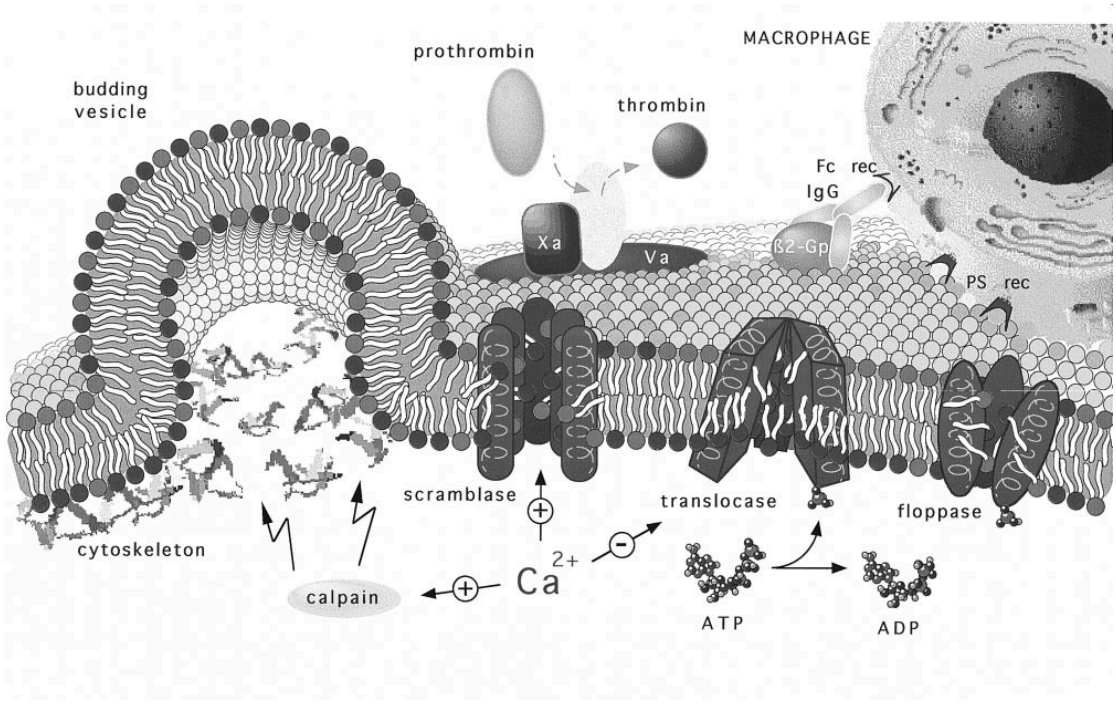


*Figure 3: Asymétrie de distribution des PS : États physiologique et pathologique (*25*)*

Cette figure décrit comment l'asymétrie de la distribution des phospholipides membranaires est générée, maintenue, et perturbée dans divers processus physiopathologiques liés aux PS des cellules sanguine.

La phosphatidylsérine est un phospholipide membranaire. C'est un composé amphiphile renfermant dans sa structure un groupe phosphore et est constitué d'une « tête » hydrophile et deux « queues » aliphatiques hydrophobes (figure 4).

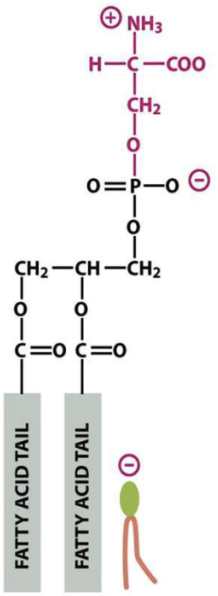


Figure 4: Structure de la PS (25,26)

La PS a un rôle clé dans de nombreuses activations et recrutements enzymatiques, soit une implication dans divers évènements de clairance des cellules apoptotiques ou d'internalisation des virus par des cellules hôtes (*27*). La phosphatidylsérine (PS) est le phospholipide à charge négative le plus abondant dans les membranes eucaryotes. Elle dirige la liaison des protéines qui portent des domaines C2 ou gamma-carboxyglutamiques et contribue à l'association électrostatique des ligands polycationiques avec les membranes cellulaires.

3.2 INDUCTEURS DE L'EXPOSITION DE LA PHOSPHATIDYLSERINE A LA SURFACE CELLULAIRE

3.2.1 Activation plaquettaire

Les plaquettes sanguines sont de petits fragments anucléés, produits à partir des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Au repos, elles circulent à raison de 150 à 350 000 plaquettes par µl de sang sous forme de petites lentilles discoïdes de près de 7 µm de diamètre pour un volume moyen de l'ordre de 10 µm3. Elles s'activent rapidement au contact d'une paroi vasculaire lésée, changent de forme, émettent de longs filopodes, s'étalent sur la surface, sécrètent le contenu de leurs granules de sécrétion, recrutent des plaquettes circulantes pour former un clou hémostatique, composé principalement de plaquettes mais aussi de fibrine produite au contact des plaquettes activées par la thrombine générée localement. Lors de l'activation, les plaquettes subissent également une modification de forme, passant de discoïde à globulaire, puis elles émettent des protrusions membranaires, à la suite de la réorganisation du cytosquelette par des protéases calcium

dépendantes. Cette modification conformationnelle s'accompagne de la formation de microparticules libérées de la membrane plaquettaire. Ce processus de micro-vésiculation survient à la suite de la réorganisation des phospholipides membranaires, de telle sorte que les aminophospholipides soient exposés sur la surface des microvésicules, leur conférant une activité pro-coagulante (*28*, *29*). La quantité de PS exposée sur le versant externe de la membrane est alors considérablement augmentée, passant de 2% à environ 12% des phospholipides membranaires, ce qui représente environ 100 000 molécules de PS sur des plaquettes exposées à un mélange de thrombine et de collagène. Ces phospholipides chargés négativement sont des cofacteurs nécessaires à la liaison des facteurs de la coagulation et à la formation des complexes tenase (*25*, *30*). Ainsi, les plaquettes les plus activées, que l'on rencontre dans les couches les plus profondes de la paroi lésée sont le siège de l'amplification de la génération de thrombine et le lieu de formation des premières fibres de fibrine qui ancrent le thrombus à la paroi et contribuent à sa stabilité. Le processus d'externalisation de la PS requiert une activité dite « scramblase » dont le substrat moléculaire a été identifié récemment. Il s'agit d'une protéine transmembranaire appelée TMEM16F qui forme un canal cationique activé par le calcium (*31*).

3.2.1.1 Thrombus

L'ILT correspond à un néo-tissu développé au contact de la paroi vasculaire. Il s'agit d'une structure en couches multiples, correspondant à des degrés de protéolyse progressivement croissante des éléments qui le composent à mesure que l'on s'éloigne de la couche luminale. Cette dernière, située à l'interface entre l'ILT et le sang circulant, représente la zone de renouvellement du thrombus à partir des composants provenant du sang circulant. La couche luminale est biologiquement très active, caractérisée par une activité procoagulante dont témoigne la formation d'un réseau de fibrine à la suite de l'activation de la thrombine par les plaquettes nouvellement agrégées et activées. Elle est composée également d'hématies et de polynucléaires, principalement des neutrophiles.

En effet, l'endothélium vasculaire est la première barrière de protection du système vasculaire. Il contient trois thromborégulateurs qui fournissent une défense contre la formation de thrombus: l'oxyde nitrique, la prostacycline, et l'ectonucléotidase CD39 (*32–34*). Le collagène et le facteur tissulaire, qui siègent dans la matrice sous-endothéliale, facilitent le maintien d'un système circulatoire fermé. En revanche, lorsque la paroi vasculaire ou l'endothélium sont agressés, ils sont exposés au niveau de la couche luminale. Ainsi, le collagène déclenche l'accumulation et l'activation des plaquettes, alors

que le facteur tissulaire déclenche la génération de thrombine, qui non seulement transforme le fibrinogène en fibrine, mais active également les plaquettes. Cette idée que deux voies distinctes agissant en parallèle ou séparément peuvent activer les plaquettes découle d'études récentes sur la formation de thrombus chez des souris génétiquement modifiées. En fonction de la lésion ou de la maladie, une voie ou l'autre peut prédominer, mais les conséquences de l'activation des plaquettes déclenchée par ces voies sont les mêmes (*35*).

Les interactions de la glycoprotéine VI plaquettaire avec le collagène de la paroi vasculaire exposée et de la glycoprotéine plaquettaire Ib-V-IX avec le facteur de Von Willebrand lié au collagène entraînent l'adhésion des plaquettes au site lésé. L'importance relative des glycoprotéines plaquettaires VI et Ib-V-IX dans l'attachement initial des plaquettes dépend du taux de cisaillement au niveau de la paroi vasculaire. Cependant, l'interaction du collagène avec la glycoprotéine VI est requise, de même que la glycoprotéine Ib, un composant du complexe glycoprotéine Ib-V-IX. Outre son rôle dans l'adhérence des plaquettes au collagène, la glycoprotéine VI est le principal agoniste de l'activation initiale des plaquettes et de la libération des granules. L'intégrine plaquettaire $\alpha_2\beta_1$ joue un rôle de soutien mais non essentiel dans l'interaction entre les plaquettes et le collagène. L'activation plaquettaire dans cette voie initiée par le collagène est indépendante de la thrombine.

Le facteur tissulaire déclenche une deuxième voie d'initiation de l'activation plaquettaire qui ne nécessite pas de perturbation de l'endothélium et est indépendante du facteur de Von Willebrand et de la glycoprotéine VI. Le facteur tissulaire forme un complexe avec le facteur VIIa, la forme enzymatiquement active du facteur VII, qui active à son tour le facteur IX, déclenchant ainsi une cascade protéolytique générant de la thrombine. La thrombine clive le protease-activated receptor 4 sur la surface des plaquettes. Cette activation plaquettaire provoque la libération d'adénosine diphosphate (ADP), de sérotonine, et de thromboxane A_2. À leur tour, ces agonistes activent d'autres plaquettes amplifiant ainsi les signaux de formation de thrombus.

3.2.1.2 Végétation endocarditique

La physiopathologie de l'endocardite infectieuse (EI) repose sur (A) l'adhésion de bactéries sur l'endocarde lésé au cours d'un épisode de bactériémie, (B) la persistance et la croissance des bactéries au sein de la végétation, et (C) la dissémination de l'infection au cours d'emboles septiques (*36*). Habituellement, des lésions préexistantes de l'endothélium

valvulaire sont dans un premier temps couvertes de fibrine et de plaquettes. Ces végétations thrombotiques aseptiques peuvent alors être colonisées au cours d'une bactériémie (*36*). La persistance des bactéries au sein de la végétation va dépendre de leur capacité à se soustraire à la réponse immunitaire de l'hôte.

Les végétations de l'EI constituent donc un modèle d'interaction entre les bactéries et les tissus de l'hôte (*37*). Cette interaction aboutit à la formation d'un thrombus septique qui peut être responsable d'une dégradation du tissu myocardique sous-jacent (*38*) ou d'emboles périphériques. L'interaction des bactéries avec les plaquettes de l'hôte, qui constitue l'un des déterminants principaux de la formation et de la croissance des végétations, agit en renforçant le mécanisme de formation du thrombus plaquettaire, c'est-à-dire **l'activation et l'agrégation plaquettaire** (*39*,*40*) ainsi que le dépôt de fibrine-fibronectine (*41*). Il en est de même en ce qui concerne l'interaction des bactéries avec le système protéolytique de l'hôte.

Ainsi, les plaquettes sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire. Elles contribuent à la défense antimicrobienne en produisant des protéines microbicides (PMP) contenues dans les granules alpha et libérées lors de l'activation plaquettaire. Les bactéries sensibles aux PMP ne parviennent pas à coloniser les valves cardiaques en présence de plaquettes. A l'inverse, une résistance aux PMP confère aux bactéries qui la possèdent un caractère de virulence, car après adhésion, les agrégats plaquettaires vont leur fournir une protection contre les anticorps et les cellules phagocytaires (*42*).

D'autre part, le thrombus fibrino-plaquettaire siégeant sur la surface valvulaire peut servir de point d'ancrage initial aux bactéries. De même, la liaison des bactéries aux plaquettes est un déterminant majeur des événements qui vont survenir à la suite de la colonisation initiale de la surface valvulaire, particulièrement la formation et la croissance des végétations (*43*). Ces interactions, concourant à l'activation et à l'agrégation plaquettaire, mettent en jeu à la fois des composants de la bactérie et un large éventail de composants intervenant dans l'hémostase de l'hôte. De nombreux pathogènes utilisent un mécanisme globalement similaire pour provoquer l'activation plaquettaire. L'adhésion initiale a lieu soit directement, soit plus couramment grâce à un pont entre une protéine plasmatique et un récepteur plaquettaire, habituellement GIIb/IIIa ou GPIb. Cette interaction nécessite la présence d'un anticorps circulant spécifique pour une protéine de la surface bactérienne de manière à engager le récepteur plaquettaire FcγRIIa. Les anticorps sont en général déjà présents car la plupart des EI sont dues à des bactéries commensales. Cette interaction provoque l'activation, l'agrégation plaquettaire, et la formation du thrombus.

3.2.2 Apoptose cellulaire

L'apoptose (du grec: chute des feuilles en automne, avec apo pour éloignement et ptose pour chute (description en 1972 par Kerr, Wyllie et Curie) donc signifie chute en se détachant).

La mort cellulaire programmée (apoptose) résulte d'une série d'évènements contrôlés qui, lorsqu'ils sont mis en balance avec la prolifération cellulaire, sont essentiels au développement normal du tissu et à la fonction des cellules. Le dérèglement de cet équilibre est une cause de plusieurs états pathologiques, tels que les troubles neurodégénératifs, l'hypertension pulmonaire et le cancer.

Morphologiquement, l'apoptose se caractérise par une condensation nucléo- cytoplasmique précoce. Le noyau se condense (pycnose). Ceci est suivi d'un clivage de la chromatine en fragments réguliers nucléosomiques d'environ 180 pb ou oligonucléosomiques (multiple de 180pb). On peut détecter ce phénomène par électrophorèse de l'ADN et par la méthode TUNEL (*44*). La membrane plasmique quant à elle, bourgeonne et donne ainsi naissance aux corps apoptotiques qui renferment une partie du cytoplasme de la cellule et se détachent de celle-ci. Puis ils sont rapidement éliminés par les macrophages du milieu environnant. La reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes est facilitée par un changement au niveau de la membrane cytoplasmique. En effet, les molécules de phosphatidylsérines sont redistribuées du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique, par l'activation de la scramblase et l'inhibition des floppase et translocase, et peuvent être donc ciblées par l'AnxA5. Cette externalisation des PS lors de l'apoptose a été révélée en 1992 par Fadok et al. (*45*). Il a été montré que les cellules tumorales apoptotiques expriment à leur surface jusqu'à $24x10^6$ sites PS liant l'AnxA5 par cellule (*46*). De plus, les études stoïchiométriques ont montré que 4 à 8 molécules d'AnxA5 peuvent se lier par site PS exposé (*47*).

Les tissus environnants à un phénomène apoptotique sont peu impactés en raison du respect prolongé de l'intégrité de la membrane plasmatique. Toutefois il existe une composante inflammatoire qui reste régulée en raison de la libération d'IL-1 et IL-18 dans l'environnement. L'intégrité prolongée de la membrane plasmique limite le déversement du contenu cellulaire et ainsi les dommages infligés aux tissus environnants.

L'apoptose se déroule en trois étapes principales : une phase d'initiation, une phase effectrice et une dernière phase de dégradation de l'ADN.

- *Phase d'initiation :*

Il semble exister deux voies capables d'engendrer l'initiation d'un processus apoptotique. Une première voie met en jeu les récepteurs de mort (voie extrinsèque) et une deuxième voie ou voie intrinsèque est médiée par la mitochondrie. Dans les deux cas, la voie de transduction qui aboutit aux modifications biochimiques et morphologiques caractéristiques du processus apoptotique sont, en particulier, sous la dépendance des caspases.

La voie extrinsèque :

Elle fait intervenir les récepteurs de mort qui appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR) et regroupe 6 membres TRAILR1, TRAILR2, APO-3, FAS, TNF-R1. On rajoute à cette superfamille les récepteurs leurres qui présentent une grande homologie de structure sans toutefois posséder le domaine de mort fonctionnel caractéristique de la famille du TNFR. La cascade apoptotique débute ainsi par l'interaction d'un ligand (cytokines, TNF, ligand de Fas) avec son récepteur de mort spécifique. L'interaction entraîne alors le recrutement, via ce domaine de mort, de protéines intracellulaires spécifiques, comme la protéine adaptatrice FADD. La fixation de FADD permet ensuite une interaction avec des formes inactives de caspases, les pro-caspases 8 et 10. Cette association aboutit à la transformation des pro-caspases en caspases actives et donc susceptibles d'entraîner la voie effectrice aboutissant à la mort cellulaire. Il semblerait que le taux de caspases actives détermine soit une action directe, soit un passage par la voie mitochondriale qui servirait alors de mécanisme amplificateur.

La voie mitochondriale

Cette voie dite intrinsèque est activable par de nombreux stimuli, ischémie, stress oxydatif, stress génotoxique, excès de calcium, chimiothérapies, rayonnements ionisants, etc. L'apoptose induite par cette voie aboutit à la libération par la mitochondrie de cytochrome C qui peut alors s'associer dans le cytosol avec la protéine APAF-1 («Apoptotic Protease Activating Factor-1 »), de l'ATP et la pro-caspase-9 afin de former un complexe nommé apoptosome. Cet apoptosome va permettre l'activation par auto-clivage de la pro-caspase-9 en caspase-9 et donc la mise en œuvre de la cascade d'action inhérente aux caspases effectrices. L'activation de cette voie mitochondriale est sous l'étroite dépendance des membres de la famille Bcl-2, qu'ils soient pro-apoptotiques (BAX, BAZK, BID, BAD...) ou anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X_L, MCL-1...).

- *Phase effectrice, phase de destruction cellulaire et d'élimination :*

Après la phase initiatrice, les caspases activées vont à leur tour permettre l'activation du second groupe de caspases dites effectrices (caspases 3, 6, 7). Celles-ci peuvent alors cliver un certain nombre de substrats cellulaires avec des conséquences très variées en termes de perte ou de gain de fonctions. Les protéines cibles des caspases effectrices sont nombreuses puisqu'elles regroupent des protéines structurales (Actine, fodrine, gelsoline, kératines, lamines), des protéines de signalisation (de nombreuses kinases), des protéines du métabolisme ADN/ARN (Poly ADP ribose polymérase, ADN-dépendante, Histone H1, etc.) ou encore des protéines intervenant dans le cycle cellulaire (pRb,cyclinA2). La modification de ces protéines peut aboutir à une perte de fonction par inactivation (gelsoline) ou désassemblage (lamines) ou à un gain de fonction par clivage activateur (stade pro-caspase à caspase, activation de la protéine pro-apoptotique BID appartenant à la famille Bcl2 et intervenant dans l'activation de la voie mitochondriale). L'action de ces protéines effectrices détermine les caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques (dégradation de l'ADN, des corps apoptotiques excisés de la membrane plasmique et la décomposition du cytosquelette (*48*). En particulier, l'activation de la caspase 3 induit la redistribution des phospholipides au sein de la membrane plasmique, avec exposition à la surface cellulaire de la PS détectée par ses ligands spécifiques en particulier l'AnxA5 et dérivés (*49*).

4. LES LIGANDS PEPTIDIQUES D'INTERET POUR LE CIBLAGE ET L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS

Il existe différents prérequis à l'utilisation de peptides en médecine nucléaire pour une scintigraphie et surtout pour la thérapie compte tenu des doses utilisées :

- la cible doit être en quantité suffisante et de préférence surexprimée afin de pouvoir obtenir une image par détection externe.
- Le peptide doit avoir une affinité pour son récepteur de l'ordre du nanomolaire, voisine du peptide naturel.

Il est à noter que les modifications structurelles peuvent modifier l'activité biologique. A cause de la petite taille du peptide, la fixation d'un chélate et du radionucléide peut augmenter significativement le poids moléculaire et provoquer un changement conformationnel pouvant modifier la séquence de reconnaissance. De ce fait, le site d'attachement du radionucléide doit être le plus éloigné possible du site biologiquement actif. Un petit synthon d'espacement doit parfois être introduit.

- La spécificité du peptide pour le récepteur est aussi un prérequis. La fixation de l'isotope peut modifier la sélectivité pour certains sous-types du récepteur. Les agonistes sont préférés car ils sont souvent internalisés avec médiation du récepteur dans la cible provoquant ainsi leur accumulation, ce qui augmente le signal. Dans le cadre d'une application thérapeutique, l'internalisation est nécessaire car les rayonnements doivent agir au niveau de l'ADN.
- Les autres prérequis sont un radiomarquage avec un haut rendement, une activité spécifique et une stabilité du marquage *in vitro* élevées. Ces molécules d'origine biologique sont plus facilement reconnues par les enzymes de l'organisme, d'où un risque élevé de protéolyse et un risque de métabolisation qui doit être évalué.

Les peptides peuvent être considérés comme des agents de choix pour des applications diagnostiques et thérapeutiques en médecine nucléaire. De nombreux peptides ont déjà été radiomarqués essentiellement dans le diagnostic des cancers. En fonction du radio-isotope utilisé, la tumeur peut être soit visualisée, soit traitée.

Les vecteurs peptidiques ont des avantages par comparaison aux vecteurs protéiques. Ils ont la particularité d'une production plus simple et moins coûteuse (*50*). Ils ont une biodistribution plus favorable. Leurs accès à la cible est plus facile du fait de leur petite taille, et ont une moindre immunogénéicité (*51–54*).

En 1995, Igarashi et al. ont rapporté une nouvelle séquence consensus de 14 acides aminés partagée par la protéine kinase C et la PS décarboxylase sont considérées comme un site de liaison de la PS. Un peptide synthétique dérivé de cette séquence, FNFRLKAGQKIRFG (appelé peptide de liaison à la PS de première génération ou PSBP-0) a montré une liaison sélective à la PS. Cependant, l'affinité de liaison de PSBP-0 à PS est relativement faible. Elle est de l'ordre du micromolaire basée sur une analyse de biocapteur par résonance plasmonique de surface (SPR), donc son développement pour un agent d'imagerie n'a pas été intéressant (*55*, *56*).

Peu de peptides ciblant la PS ont été développés comme agents d'imagerie. Parmi les tentatives de développements d'agents d'imagerie peptidiques de la PS, Burtea et coll. ont isolé par la technique de Phage Display des peptides qui se lient spécifiquement à la PS avec une affinité élevée (PGDLSR (R824), DAHSFS (R825) et LIKKPF (R826)).

La complexation des peptides sélectionnés au gadolinium a permis de mettre au point un agent de contraste pour l'imagerie de l'athérosclérose (*50*). Un autre peptide, le PSP1(CLSYYPSYC) a été conjugué à un fluorophore par Kim et coll. et a montré une

supériorité de ciblage des cellules apoptotiques dans un modèle de cancer de souris traitées par camptothécine (*51*).

5. LES LIGANDS PROTEIQUES D'INTERET POUR LE CIBLAGE ET L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS

Les ligands protéiques ont évolué de l'anticorps monoclonal Fab' vers les fragments Fab et finalement aux petits peptides synthétiques. Les anticorps sont des molécules de grande taille et de haut poids moléculaire, ce qui limite leur fixation à la cible et ralentit la clairance sanguine ; il en résulte un faible rapport cible / bruit de fond (sang).

5.1 LACTADHERINE

La lactadhérine est une glycoprotéine secrétée par les glandes mammaires. Son rôle physiologique reste obscur. Elle est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages. Récemment, la glycoprotéine lactadhérine (également connue sous le nom MFG-E8) a été présentée comme marqueur sensible de la PS (57,58). Elle a été marquée au technétium (^{99m}Tc-lactadherin) et a permis une visualisation de la PS externalisée sur les cellules apoptotiques (59).

En effet, il a été précédemment rapporté que les domaines C-terminaux (C1C2) de la lactadhérine (également connue sous le nom de PAS-6/7 ou MFG-E8) se lient à la PS d'une manière stéréospécifique indépendante du calcium (*57*). En outre, les domaines de facteur de croissance épidermique N-terminaux de la protéine contiennent une séquence Arg-Gly-Asp (RGD), la séquence d'acides aminés qui médie l'adhésion cellulaire par la reconnaissance des intégrines $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_3$. Les affinités de liaison doubles ont conduit à la notion que la lactadhérine agit comme une opsonine qui facilite la phagocytose PS-dépendante des cellules apoptotiques (*60,61*), comme confirmé ultérieurement in vivo (62).

Des études récentes suggèrent que la lactadhérine permet la détection de l'exposition superficielle de la PS dans les cellules apoptotiques en suspension à un moment plus précoce que l'AnxA5 (57,58,63). De plus, on sait que la lactadhérine et l'AnxA5 divergent dans leur spécificité vis-à-vis du PS. En effet, la liaison de l'AnxA5 à la PS nécessite du Ca^{2+} et est améliorée en présence la phosphatidyléthanolamine (64), alors que la lactadhérine n'est affectée ni par le Ca^{2+} ni par la phosphatidyléthanolamine (65). En outre, la liaison de la lactadhérine est fortement positive dans les membranes sphériques avec une teneur en PS de 0-2%. En revanche,

l'AnxA5 lie les mêmes membranes de manière sigmoïdale avec un seuil supérieur à 4% de PS (*66,67*).

Dans une étude récente comparant la pharmacocinétique des deux traceurs (^{99m}Tc-lactadhérine et ^{99m}Tc-AnxA5) chez les cochons (*68*), il a été conclu que, tout comme l'AnxA5, la ^{99m}Tc-lactadhérine a une absorption hépatique élevée, ce qui compromet l'utilisation de ^{99m}Tc-lactadhérine pour l'imagerie de l'externalisation de la PS dans le foie, ou dans la région thoracique inférieure ou abdominale supérieure. En revanche et contrairement à ^{99m}Tc-AnxA5, la ^{99m}Tc-lactadherine a une faible absorption rénale et peut être le traceur préféré pour l'imagerie de l'externalisation PS dans les reins. La dose efficace après l'injection de ^{99m} Tc-lactadherine et ^{99m} Tc-AnxA5 était faible. Pour des recommandations d'utilisation clinique de la ^{99m}Tc-lactadhérine, des études de cinétique du radiotraceur s'imposent chez les patients sains.

5.2 ANNEXINE A5 (AnxA5) :

Cette partie sera reprise plus en détails dans le chapitre 6.

En résumé, dans l'espèce humaine l'AnxA5, est le ligand protéique naturel le plus largement utilisé pour le ciblage de la PS. Il s'agit d'une protéine endogène (36 kDa) qui se lie spécifiquement et avec une affinité nanomolaire à la PS (69), selon une réaction calcium-dépendante. Elle fait partie de la superfamille des annexines qui sont toutes caractérisées structurellement par la présence de deux domaines : une « tête » ou extrémité N-terminale qui est variable en fonction de l'annexine et responsable de la spécificité fonctionnelle de chaque annexine, (70) et un « noyau » ou domaine COOH bien conservé d'une annexine à une autre (*71*). Le noyau de l'annexine est composé de 4 domaines homologues d'environ 70 acides aminés (I, II, III et IV) (69,70,72) composé chacun de 5 segments α-hélicoïdaux (A, B, D et E) disposés de façon cylindrique et coiffés par l'hélice C (72). La forme générale de ces molécules est celle d'un disque légèrement plié dans lequel les quatre domaines répétitifs sont disposés autour d'un trou central hydrophile qui pourrait être responsable de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants lorsque l'Annexine se lie aux membranes.

6. IMAGERIE MOLECULAIRE DE LA PS PAR LES ANNEXINES

6.1 LES FAMILLES DES ANNEXINES (ANX)

Les annexines sont une grande famille de protéines découvertes il y a une vingtaine d'années, et étonnamment conservées dans l'évolution des eucaryotes supérieurs. Absentes chez les bactéries et les levures, on les retrouve aussi bien chez les plantes et les algues,

chez l'hydre, la drosophile et chez les vertébrés. Elles sont impliquées dans divers phénomènes biologiques: la fusion membranaire, la prolifération et la différenciation cellulaire ou la réponse inflammatoire. Cette famille comprend plusieurs membres, avec des structures différentes. Elles peuvent avoir plusieurs rôles physiologiques comme détaillé dans la figure 5.

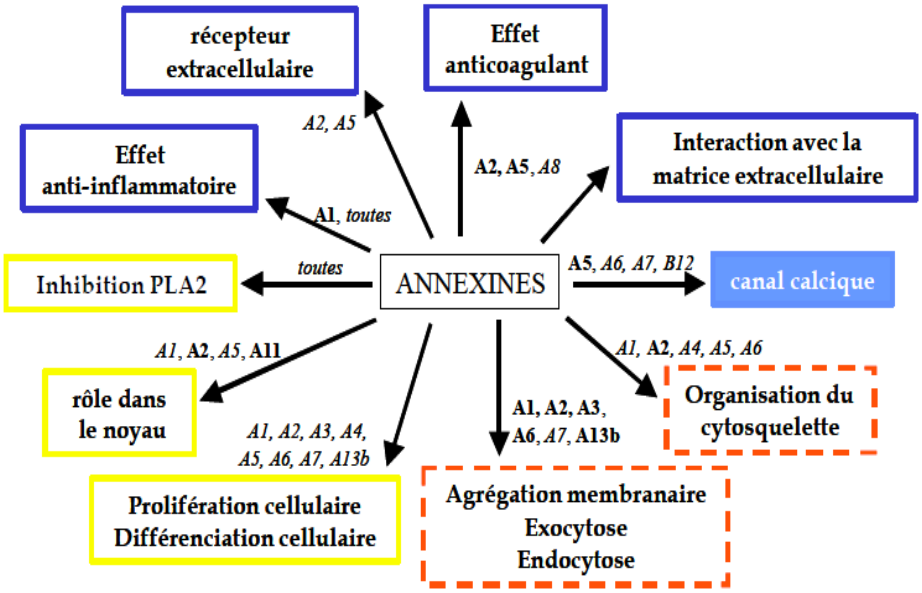


Figure 5: Rôle des Annexines (73)

Les Annexines pourraient être impliquées dans 4 types de fonctions: la perméabilisation des membranes (bleu), le trafic cellulaire (orange), le contrôle du cycle cellulaire (jaune) ou la réponse aux agressions (vert). Les Annexines impliquées in vivo dans ces fonctions apparaissent en gras, celles impliquées in vitro en italique

6.1.1 Définition et nomenclature

Une protéine appartient à la famille des annexines lorsque sa séquence est constituée de 4 (ou 8) domaines répétés contenant un site de liaison au calcium, et lorsqu'elle est capable de se lier aux phospholipides membranaires en présence de calcium. C'est une famille multigénique dont les membres ont été isolés indépendamment au début des années 1980. D'abord nommées d'après les propriétés qui permirent de les isoler, les protéines de cette famille ont été rebaptisées "Annexines" dans les années 90 et récemment une nouvelle nomenclature basée sur la taxonomie a été mise en place ; ainsi chaque molécule peut être connue sous plusieurs noms (Tableau 2).

Tableau 2 : Les noms des Annexines d'après Morgan & Fernandez (1999)

Annexine A1	Annexine I	Lipocortin I, Calpactin II, Chromobindin 9, p35
Annexine A2	Annexine II	Lipocortin II, Calpactin I (hc), Chromobindin 8, Protein I, PAP IV, p36
Annexine A3	Annexine III	Lipocortin III, PAP III, 35α Calcimedin
Annexine A4	Annexine IV	Endonexin I, Protein II, 32.5 kDa Calelectrin, Lipocortin IV, Chromobindin 4, PAP II, PP4-X, 35β Calcimedin
Annexine A5	Annexine V	Lipocortin V, 35 kDa Calelectrin, Endonexin II, PP4, PAP I, VAC-α, 35γ Calcimedin, Calphobindin I, Anchorin CII
Annexine A6	Annexine VI	Lipocortin VI, Chromobindin 20, Protein III, 67kDa Calelectrin, 67kDa Calcimedin, Calphobindin II
Annexine A7	Annexine VII	Synexin
Annexine A8	Annexine VIII	VAC-β
Annexine A9	Annexine XXXI	
Annexine A10	Annexine XXXII	
Annexine A11	Annexine XI	
Annexine A13	Annexine XIII	Intestinal specific annexin

A : deutérostomiens (échinodermes, procordés, vertébrés)
12 sous-familles avec 90 gènes de 23 espèces.

B : protostomiens (annélides, arthropodes)
12 sous-familles avec 20 gènes de 11 espèces. Anciennement Annexine IX, X, XII, XV à XVII, XXX, Q à Z.
C : champignons
1 sous-famille avec 2 gènes de 2 espèces. Anciennement Annexine XIV
D : plantes
12 sous-familles avec 41 gènes de 25 espèces. Anciennement Annexine XVIII, XXII à XXIX.
E : protistes
2 sous-familles avec 3 gènes d'une espèce. Anciennement Annexine XIX à XXI.
F : procaryotes, inconnus à ce jour.
L : Annexin-Like, pour les fragments en cours de classification.

6.1.2 Séquence et structure tertiaire

Les structures primaires et tertiaires des Annexines s'organisent en 4 domaines structuraux et fonctionnels de 70 acides aminés composés de 5 hélices nommées de A à E, avec les extrémités amino- et carboxy-terminale de la protéine du côté concave. Les sites calcium de la protéine sont tous du côté convexe et presque dans un même plan. Vue de dessus, la protéine paraît avoir un arrangement cyclique avec les domaines 1-4 et 2-3 de part et d'autre d'un pore central (figure 6) (Huber 1990).

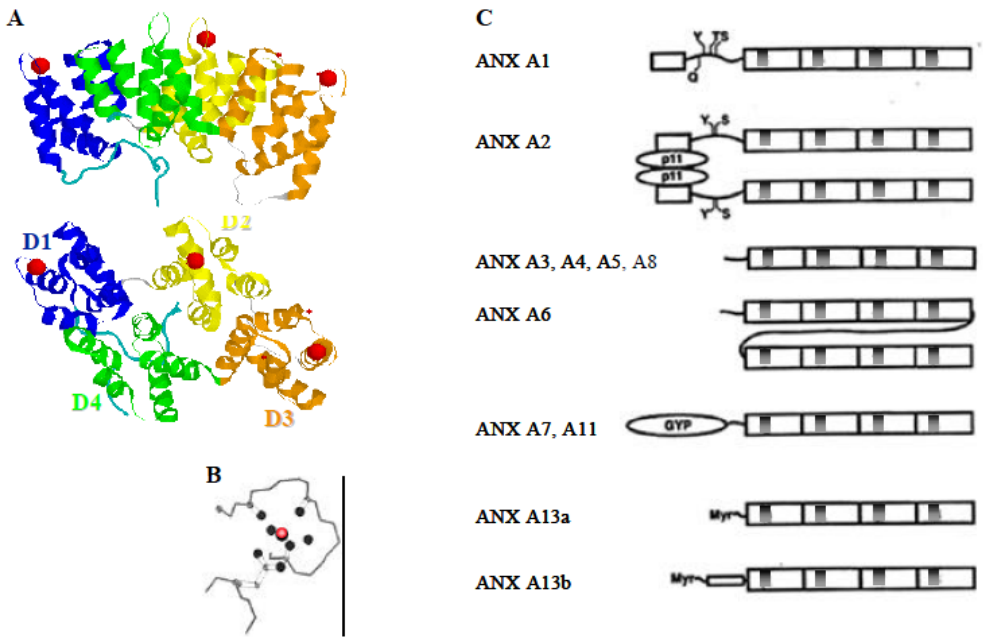


Figure 6: Structure des Annexines (74)

A : La **structure de l'ANX A3** est présentée ici avec son architecture en 4 domaines répétés. Le N- et le C-terminal sont en bleu clair. Les ions calciums sont représentés par des boules rouges. Favier-Perron (1996) Biochemistry 35 : 1740-1744.
B : **Site calcium des annexines**. L'ion est représenté par une grosse boule au centre, on voit la boucle A-B en haut et l'acide aminé de la boucle D-E portant une fonction acide en bas.

C : Organisation et modifications des annexines. Les 4 domaines répétés sont représentés par des rectangles contenant la séquence consensus en dégradé de gris. Les portions N-terminales varient de 12 à 200 acides aminés, certaines peuvent être partiellement structurées. Pour les ANX A1 et A2, une hélice α (schématisée par un rectangle) se forme et permet la liaison aux protéines S100. Il y a également des sites de phosphorylations in vivo sur sérine (S)/thréonine (T) ou tyrosine (Y) et un site transglutamination pour l'ANX A1 (Q). Les ANX A3, A4, A5 et A8 ont un N-terminal très court. L'ANX A6 est constituée de deux fois quatre répétitions du domaine structural. Les ANX A7 et A11 ont un N-terminal très long riche en glycine, tyrosine et proline (GYP), qui formerait un feuillet β. L'ANX A13 peut être myristilée (Myr), il existe 2 variants d'épissage.

6.1.3 Structure du site calcium des Annexines

La séquence caractéristique des Annexines correspond au site de fixation du calcium. Il s'agit du motif (M/L)-(K/R)-(G/R)-X-G-T-X38-(D/E) (*75*) qui code pour la boucle entre les hélices A-B et un acide aminé sur la boucle D-E dans chaque domaine (figure 1B). Ce type de site calcium est tout à fait original. Il est appelé site calcium de type II par opposition au type I surnommé "main E-F". Il existe enfin chez les Annexines des sites calcium secondaires (dit de type III) de moindre affinité et moindre spécificité qui semblent avoir un rôle négligeable *in vivo*.

6.1.4 Flexibilité et changement de conformation

Les annexines sont flexibles le long du pore central qui sépare les domaines 1-4 et 2-3 comme une charnière, régulée par la concentration en calcium (*76*). D'autre part, plusieurs Annexines ont un tryptophane dans le domaine 3 qui peut être exposé au solvant en fonction des conditions environnementales (calcium, pH, proximité de membranes). La

flexibilité centrale des annexines ainsi que le changement de conformation du tryptophane modulent l'interaction avec les membranes.

6.1.5 Liaison des Annexines aux membranes cellulaires:

L'affinité intrinsèque des annexines pour le calcium est plutôt médiocre (de 10^{-5} à 10^{-3}M), mais augmente beaucoup en présence de phospholipides (10^{-6}M). Considérées comme des "protéines à calcium", les annexines sont plus exactement des protéines liant les phospholipides en présence de calcium.

Plusieurs méthodes structurales ont permis d'élaborer un modèle de cette interaction annexines/membranes: la face convexe des protéines lie les membranes via un pont électrostatique entre les ions calcium engagés dans les sites et les têtes polaires des phospholipides. Le rôle du tryptophane (W) exposé au solvant dans le domaine 3 de plusieurs annexines a longtemps été mis en question. Les premiers modèles suggéraient une insertion de ses cycles aromatiques dans le feuillet membranaire, il jouerait un rôle d'ancre de l'annexine dans la membrane. Il semble en fait que le W187 de l'AnxA5, dont la conformation change en fonction de nombreux paramètres, serve d'interface avec la membrane mais ne s'y insère pas (*71*).

L'interaction des annexines avec les membranes n'est pas anodine pour la structure membranaire. Il a été montré pour l'AnxA4 puis pour l'AnxA5 que les annexines figent les phospholipides auxquels elles sont liées et empêchent leur diffusion normale dans la bicouche lipidique. Des clusters de phospholipides anioniques se forment lorsque les annexines s'auto-associent en réseau, ce qui perturbe la structure fluidique de la membrane et peut entraîner sa rigidification (*77*).

Les comportements de toutes les annexines ne sont pas similaires face aux membranes et les quantités de calcium nécessaires pour fixer les différentes têtes polaires des phospholipides varient d'un facteur mille. Deux classements en ressortent: celui de la préférence pour les têtes polaires: PA >PS = PI = PE et celui des annexines selon leur affinité pour les lipides: (AnxA2-S100A10)2>> AnxA2> AnxA1> AnxA6> AnxA4= AnxA3= AnxA5. Les modifications post-traductionnelles des annexines comme la phosphorylation ou l'association à une protéine S100 influent sur leur liaison aux lipides.

6.2 AnxA5

A la fin des années 1970, l'AnxA5 a d'abord été isolée du placenta humain. Quelques années plus tard, la protéine a été découverte dans les vaisseaux sanguins. Il s'agit d'une protéine vasculaire anticoagulante nommée (VAC-α) en raison de sa propriété d'inhiber la

coagulation du sang. Le mécanisme anticoagulant est basé sur la liaison à haute affinité à la PS. Cette propriété rend l'AnxA5 très efficace pour inhiber le complexe prothrombinase. Plusieurs revues ont publié les caractéristiques biophysiques, biochimiques, et propriétés biologiques de l'AnxA5 (*31*, *55*–*58*). L'élucidation de sa structure primaire a révélé que VAC-α était membre de la famille annexine, d'où l'appellation d'AnxA5. Au cours de la dernière décennie, plus de 100 membres de la famille des annexines ont été découverts. Ces découvertes ont conduit à une nouvelle adaptation de la classification des Annexines en introduisant 5 groupes majeurs (A-E). Selon ce système, l'annexine V humaine a été renommée l'AnxA5. Après sa découverte, l'AnxA5 a été produite par l'expression de son ADN complémentaire dans la bactérie Escherichia coli (*59*, *60*). La plupart des études ont utilisé cette forme recombinante d'AnxA5.

6.2.1 Structure de l'AnxA5

L'AnxA5 est une protéine d'environ 35 500 Da composée de 320 acides aminés. La forme de l'AnxA5 est un pavé de 5x3x3 nm^3 légèrement courbé (figure 7). Huber et al sont les premiers à révéler sa structure moléculaire (*74*,*82*). C'est une structure planaire cyclique comprenant une partie N-terminale suivie de 4 domaines homologues d'environ 70 acides aminés, composés chacun de 5 segments α-hélicoïdaux. Chaque domaine comporte une séquence conservée de 17 acides aminés abritant les sites de liaison caractéristiques pour le Ca^{2+} et la phosphatidylsérine. L'AnxA5 est caractérisée également par une face concave abritant les chaines N- et C-terminales, alors que la face convexe qui se lie à la membrane porte les sites de liaisons du calcium. La liaison entraîne peu de modifications de structure de l'AnxA5, seule une boucle du domaine III contenant un tryptophane (Trp-187) est externalisée de la protéine (*83*,*84*).

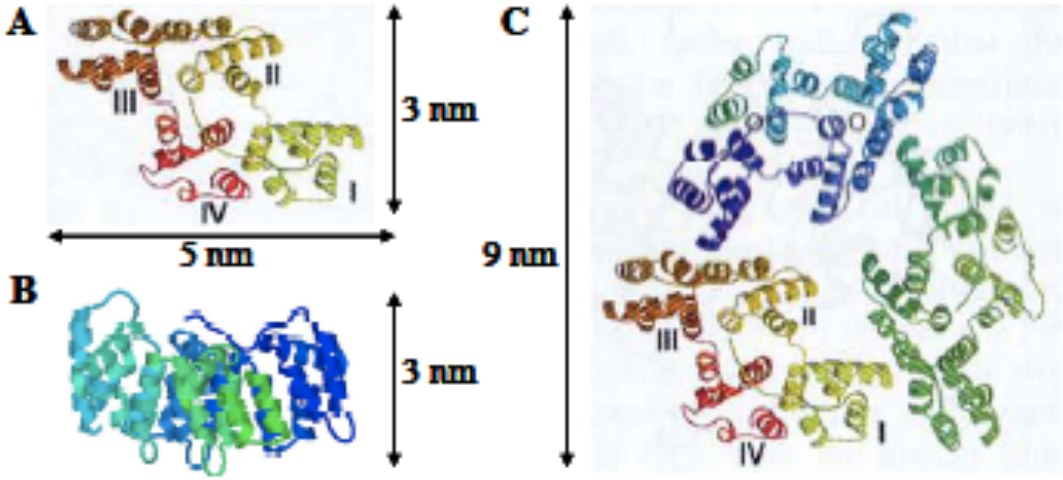


Figure 7: Structure de l'Annexine-A5 (74)

6.2.2 Développement de l'AnxA5 comme outil de diagnostic

En 1992, Fadok et al. (*45*) a révélé que la PS est exprimée sur la surface membranaire des cellules apoptotiques. Par contre, les cellules viables gardent la PS dans la membrane interne de la cellule. Cette notion conduit Koopman et al.(*86*) à concevoir un test de détection d'apoptose sur la base de fluorescence (AnxA5 marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine). Pour pouvoir discerner les cellules apoptotiques de celles nécrotiques dont l'intégrité de la membrane plasmique est compromise, l'iodure de propidium (IP) a été ajouté : Cellule vivante : Annexine négatif / IP négatif ; Cellule apoptotique : Annexine positif / IP négatif ; Cellule en nécrose: Annexine plus ou moins positif / IP positif. Les cellules viables, apoptotiques et nécrotiques peuvent être discriminées par soit microscopie à fluorescence, soit cytométrie en flux.

Le test d'affinité AnxA5 a été développé par le marquage de l'AnxA5 avec de la biotine ou des radionucléides pour permettre divers protocoles de mesure de l'apoptose *in vitro* et *in vivo* dans les modèles animaux (*87*). La disponibilité de la ^{99m}Tc-AnxA5 produite selon les impératifs Good Manufacturing Practice (GMP), a conduit à la réalisation d'une étude non invasive de l'apoptose chez les patients.

Tait et al ont mesuré l'affinité de mutants de l'AnxA5 par des tests de liaison sur des vésicules phospholipidiques *in vitro* (*88*). Ils ont montré que l'affinité des mutants dont 3 domaines ont été inactivés (mutations sur les sites de liaison aux phospholipides des

domaines 2, 3, 4 ou 1, 2, 4) ont une affinité diminuée de 60% par rapport à l'AnxA5 sauvage. Ceux dont 2 domaines ont été inactivés (2, 3 ou 1, 4) ont une affinité diminuée de moitié. Les auteurs concluent que la préservation d'au moins 3 domaines actifs de l'AnxA5 est nécessaire pour garder une affinité de liaison suffisante pour l'imagerie *in vivo* (*89*). Ceci a également été démontré dans le travail de Sarda et al qui ont comparé l'imagerie par ^{99m}Tc-AFIM et ^{99m}Tc-BTAP-AnxA5 dans un modèle expérimental d'ischémie reperfusion myocardique. En effet, l'AFIM est un peptide dérivé du domaine I qui a été produit et stabilisé par une série de mutations et modifié de façon à être couplé à des émetteurs radioactifs, et ce en se basant sur des études qui ont montré que les sites de fixation situés au niveau du domaine I jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la phospholipase A2, tandis que le autres n'ont qu'un rôle secondaire (domaine IV) ou très faible (domaines II et III) (*90*). Dans le modèle d'ischémie-reperfusion le rapport signal sur bruit sur les images scintigraphiques et en autoradiographie sont significativement plus élevés avec le ^{99m}Tc-BTAP-AnxA5.

6.2.3 Radiomarquage de l'AnxA5

Le radiomarquage de AnxA5 par des radioisotopes émetteurs de photons gamma ou de positons, respectivement détectables par gamma camera (TEMP) ou caméra à positons (TEP), a permis rapidement d'envisager son utilisation en imagerie scintigraphique *in vivo* chez l'animal puis chez l'homme.

L'AnxA5 recombinante, produite à partir du la souche Escherichia Coli BL21 (DE3), ainsi que nombre de ses dérivés ont été radiomarqués par différents halogènes (isotopes de l'iode et fluor-18), ^{99m}Tc, $^{l'111}$In, le $^{67/68}$Ga et le ^{64}Cu. Les principales caractéristiques des traceurs dérivés de l'AnxA5 recombinantes sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: Fonctionnalités, avantages et inconvénients des isotopes et des radiopharmaceutiques marqués à l'annexine A5 (69)

^{m}Tc-HYNIC-AnxA5	140.5 KeV	6.02 h	A: méthode de marquage simple, kits prêts à l'emploi I: fixation élevée dans les reins, le foie; longue 1⁄2 vie biologique.
^{99m}Tc-EC-AnxA5	140.5 KeV	6.02 h	A: méthode de marquage simple, kits prêts à l'emploi I: encore peu de données *in vivo*
^{99m}Tc-AnxA5 (général)	ß$^{+}$, 2.5 MeV	53 mn	A: marquage facile utilisant l'HYNIC-AnxA5 I: cher, difficile à obtenir et courte période radioactive
^{123} I-AnxA5	160 KeV	13 h	A: pas de fixation dans le foie et les reins après 12 h; bonne imagerie de l'abdomen; bonne PRC I: marquage laborieux; plus cher que les dérivés ^{99m}Tc
^{124}I-AnxA5	ß$^{+}$, E = 1.53, 2.14 MeV, Plusieurs photons gamma de haute énergie	4.2 jours	A: traceur TEP à longue période; pas de déiodation détectable jusqu'à 4 jours; PRC > 95% I: haute radiotoxicité donc peu envisageable en clinique; marquage laborieux
^{125}I-AnxA5	EC, 35 keV	60 jours	A: longue période; intérêt en recherche I: pas d'imagerie possible *in vivo*
^{111}In-AnxA5	173keV, 247 keV Rx 23keV (Capture électronique)	2.8 jours	A: longue période, pourrait être utile pour l'imagerie de la réponse tumorale chez les patients I: biodistribution influencée par la méthode de conjugaison; celle des PEG-In-AnxA5 apparaît peu favorable; relativement irradiant pour les patients
^{18}F-AnxA5	ß$^{+}$, 633 KeV	110 mns	A: ^{18}F optimal pour l'imagerie TEP; traceur prometteur pour l'imagerie clinique I: très peu de données d'imagerie; la méthode de marquage n'est pas encore standardisée
^{67} Ga-DOTA-AnxA5	93 KeV	3,26 jours	A: demi-vie sanguine et radioactive longue permettant des images tardives intéressant en pathologie tumorale I: moindre qualité de l'imagerie, encore peu de données
^{68} Ga-DOTA-AnxA5	ß$^{+}$, 1,9 MeV	1,13h	A: demi-vie biologique allongée mais I: période radioactive identique au ^{18}F et dosimétrie
^{64} Cu-AnxA5	ß$^{+}$, 578 KeV, 653 KeV	12,7h	A: demi-vie radioactive >^{18}F, intéressant en pathologie tumorale I : très peu de données d'imagerie

Toutefois, l'AnxA5 radiomarquée au ^{99m}Tc est le radioligand le plus utilisé en imagerie *in vivo*. En effet le ^{99m}Tc dispose de multiples avantages en comparaison aux autres radionucléides : disponibilité immédiate via un générateur, coût faible, énergie d'émission parfaitement adaptée aux gamma-caméras (140KeV) et enfin demi-vie radioactive de 6h optimisant le temps d'imagerie en fonction de la biodistribution du traceur. Nous préciserons plus loin les techniques de marquage de l'AnxA5 au ^{99m}Tc.

- ***Utilisation de l'annexine A5 comme traceur TEP pour l'imagerie de la PS :***

Les avantages de l'imagerie TEP par rapport à l'imagerie monophotonique ont contribué à l'expansion de son utilisation en Europe et dans le monde. C'est l'utilisation des traceurs fluorés qui est la plus répandue. L'énergie du positon émis par le ^{18}F (634 KeV) permet d'obtenir une résolution spatiale des plus élevées en imagerie nucléaire, ce qui en fait l'isotope de référence pour ce type d'imagerie. Son utilisation pour le développement de nouveaux traceurs est cependant limitée aux centres qui sont équipés de cyclotrons

Plusieurs équipes ont travaillé sur le marquage de l'AnxA5 par un émetteur de positons. Li et coll ont utilisé le groupement (N-[4-[(4-[^{18}F] fluorobenzylidene) aminooxy]butyl]maleimide) (^{18}FFBABM). Aucune perte d'affinité à la cible n'a été constatée par rapport à l'AnxA5 native. Cependant, aucun essai *in vivo* n'a été réalisé (*91*). D'autre part, un dérivé Cys-AnxA5 a été marqué au ^{68}Ga avec une synthèse chimique multi-étapes lente et nécessitant plusieurs étapes de purification. Un couplage au ^{68}Ga-maléimide a été réalisé. La molécule testée dans un modèle de souris immunodéprimée ayant reçu une greffe de cellules dérivées de lymphome de Burkitt a montré une clairance sanguine rapide avec une forte fixation au niveau rénal. La fixation tumorale chez les souris avant traitement chimiotoxique et avant radiothérapie était minime et la délimitation de la tumeur impossible par imagerie TEP. Ce signal a augmenté après traitement, mais seule une analyse concomitante TEP/IRM a permis de délimiter les tumeurs (*92*)

6.3 UTILISATION DE L'AnxA5 RADIOMARQUEE DANS L'IMAGERIE DES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

6.3.1 Imagerie de l'apoptose cellulaire

L'AnxA5 marquée au ^{99m}Tc a été très largement évaluée comme traceur de l'apoptose en oncologie, mais aussi en pathologie cardiovasculaire sur des modèles animaux et dans quelques études cliniques d'athérosclérose. Nous décrivons brièvement l'état de l'art de l'imagerie moléculaire par l'AnxA5 en pathologie cardiovasculaire.

6.3.1.1 Apoptose au cours des rejets de greffe

- Cardiaque (rat) : une augmentation de la fixation myocardique de l'AnxA5 au cours des greffes cardiaques allogéniques chez le rat a été observée. Cette fixation diminue après traitement par cyclosporine. En revanche il n'existait pas d'augmentation de la fixation au cours des greffes syngéniques (*87*) (figure 8)

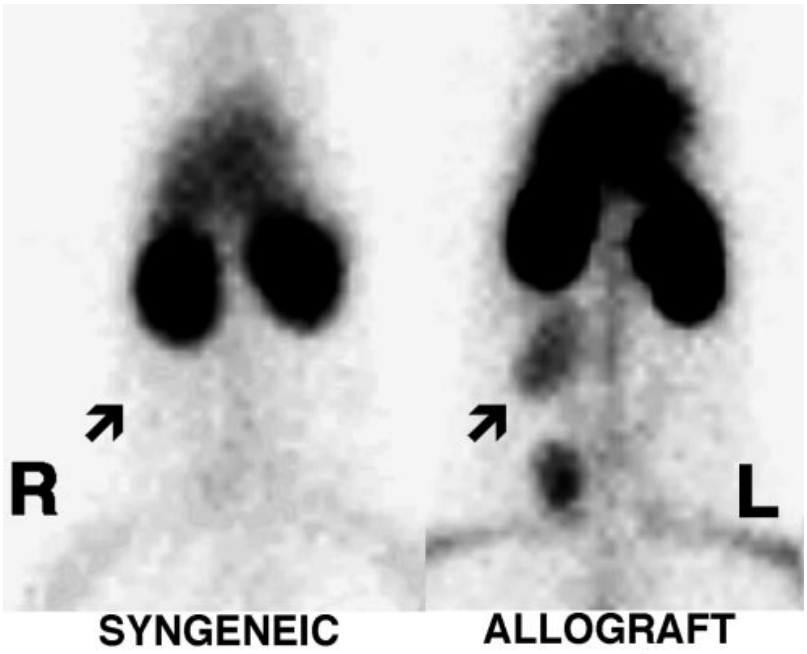


Figure 8 : Image planaire représentative après injection de ^{99m}Tc HYNIC-AnxA5 chez des rats avec allogreffe cardiaque :Il existe une fixation significative sur l'allogreffe cardiaque (flèche de droite) et sans aucune fixation du traceur chez le rat avec une isogreffe syngénique (image de gauche 5R) (95,89)D'après Blankenberg et al, QJ Nucl Med 1999

6.3.1.2 Apoptose induite par hypoxie-reperfusion

- Hypoxie-reperfusion cérébrale chez le rat : une augmentation (x 2 à 3) de la fixation de l'AnxA5 a été observée dans l'hémisphère lésé par rapport à l'hémisphère controlatéral sain dès 2h après la reperfusion (*94*)
- Ischémie-reperfusion myocardique chez le rat :

  Une fixation intense de l'AnxA5 a été observée dans la zone ischémique dès 0,5-1h après reperfusion, qui diminue ensuite d'intensité jusqu'à 3 jours. Le marquage TUNEL (% des cellules TUNEL +) est maximal 24h après reperfusion (*95*).

6.3.1.3 Myocardite auto-immune

Tokita et al. (*96*) ont montré que la captation du ^{99m}Tc-AnxA5 et du ^{14}C-DG (Deoxy-D-glucose) augmente dans les foyers d'inflammation dans les myocardites. Une forte corrélation entre la localisation des foyers d'apoptose cellulaire déterminée par le marquage TUNEL et la fixation de ^{99m}Tc-AnxA5 été établie. La fixation du^{14}C-DG est

corrélée avec la distribution des cellules inflammatoires. En revanche, les sites d'inflammation et les zones d'apoptose cellulaire changent en fonction du stade de la myocardite auto-immune. Une différence significative entre la distribution du ^{14}C-DG et celle de la ^{99m}Tc-AnxA5 (*96*) a été montrée. Cette fixation significative de l'^{99m}Tc-AnxA5 chez les rats avec une myocardite subaigüe induite par comparaison aux rats témoins a été notée par Peker et al. (*97*)

6.3.1.4 L'Athérosclérose

L'athérosclérose représente la cause principale d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque et de décès. La formation d'une plaque d'athérome s'échelonne sur de nombreuses années: elle débute dans l'enfance, peut occasionner des sténoses artérielles vers l'âge de 30-40 ans, se calcifie vers 50 ans et peut évoluer vers la plaque instable avec complications thrombotiques. On peut distinguer 6 stades évolutifs de la plaque athéromateuse, allant de la pénétration du LDL-cholestérol dans la paroi à la plaque compliquée et thrombosée.

Une plaque d'athéroslérose est dite instable ou vulnérable lorsqu'elle est susceptible d'évoluer vers une thrombose obstructive de la lumière artérielle. Les plaques riches en cellules musculaires lisses et pauvres en macrophages sont cliniquement silencieuses. Les plaques riches en macrophages capables de dégrader la matrice extra-cellulaire sont vulnérables (*98*).

Morphologiquement, une plaque vulnérable se caractérise par un volumineux noyau lipidique. Il est composé de dépôts de lipides extra-cellulaires (phospholipides, esters et cristaux de cholestérol) associés à des cellules spumeuses. Les études anatomo-pathologiques ont montré que, lorsque ce centre lipidique occupe plus de 40 % du volume total d'une plaque d'athérome, les ruptures deviennent plus fréquentes (*99*). En cas de rupture d'une plaque d'athérosclérose, la mise en contact de ces lipides associés à des corps apoptiques avec le sang circulant est extrêmement thrombogène. Ce noyau lipidique devient liquide en raison de sa richesse d'esters de cholestérol, d'une température locale élevée secondaire à la réaction inflammatoire.

L'inflammation et l'apoptose sont les éléments clé de la rupture de la plaque. Il a été constaté que les cellules musculaires lisses et les macrophages subissent une apoptose dans les plaques d'athérome instables (*100*). En effet l'apoptose dans l'athérosclérose est un évènement crucial du développement de la plaque puisqu'elle contribue soit à son érosion soit à sa rupture. Les inducteurs d'apoptose dans la lésion sont le flux turbulent, les

phospholipides oxydés, les facteurs inflammatoires, vaso-actifs ou pro-apoptotiques (TNF, IL-1, Fas-L, RLO,NO). L'apoptose des macrophages massive induit une libération de cytokines pro-inflammatoires et une saturation des mécanismes d'élimination des débris apoptotiques et micro-particules. L'apoptose des cellules musculaires lisses déstabilise la chape fibreuse et intervient dans la calcification de la plaque (niches de calcium de phosphate). L'apoptose des cellules endothéliales augmente les propriétés pro-adhésives et pro-coagulantes de l'endothélium : formation de thrombi sur érosion de plaque.

A noter que l'apoptose des macrophages se produit à tous les stades de l'athérosclérose, mais de nouvelles découvertes *in vivo* suggèrent que les conséquences de cet événement pourraient être très différentes entre les lésions athérosclérotiques précoces et les lésions tardives. Dans les lésions précoces, où la clairance phagocytaire des cellules apoptotiques semble être efficace, l'apoptose des macrophages est associée à une diminution de la cellularité de la lésion et à une diminution de la progression de la lésion. Dans les lésions tardives, cependant, un certain nombre de facteurs peuvent contribuer à une clairance déficiente des macrophages apoptotiques, conduisant à une nécrose secondaire de ces cellules et à une réponse pro-inflammatoire. L'effet cumulatif de ces événements lésionnels tardifs est la génération du noyau nécrotique qui, conjointement aux effets pro-athérogéniques des macrophages résiduels, favorise l'inflammation, l'instabilité de la plaque et la thrombose. Ainsi, la capacité ou non des phagocytes lésionnels à éliminer les macrophages apoptotiques en toute sécurité peut être un facteur déterminant des événements cliniques athéro-thrombotiques aigus (figure 9) (*101*).

L'intérêt qui a été porté à l'imagerie de la plaque d'athérosclérose par l'AnxA5 radio-marquée est dû à la présence de plaquettes activées et de corps apoptotiques. L'AnxA5 marquée a été testée dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin. La fixation de l'AnxA5 était 9 fois plus élevée dans les plaques d'athérosclérose que dans la paroi artérielle normale et était proportionnelle au degré d'infiltration par les macrophages des plaques. En auto-radiographie, l'AnxA5 radiomarquée se concentrait dans les régions riches en macrophages apoptotiques des plaques d'athérosclérose. Dans ce même modèle d'athérosclérose chez le lapin, l'intensité de fixation de l'AnxA5 marquée dans les plaques était significativement plus faible après 1 mois de traitement par statines ou arrêt du régime hypercholesterolémique qu'en cas de poursuite du régime hypercholesterolémique. Il a été également montré un intérêt potentiel dans la détection des plaques à risque chez des patients ayant présenté un accident ischémique cérébral récent (*102*).

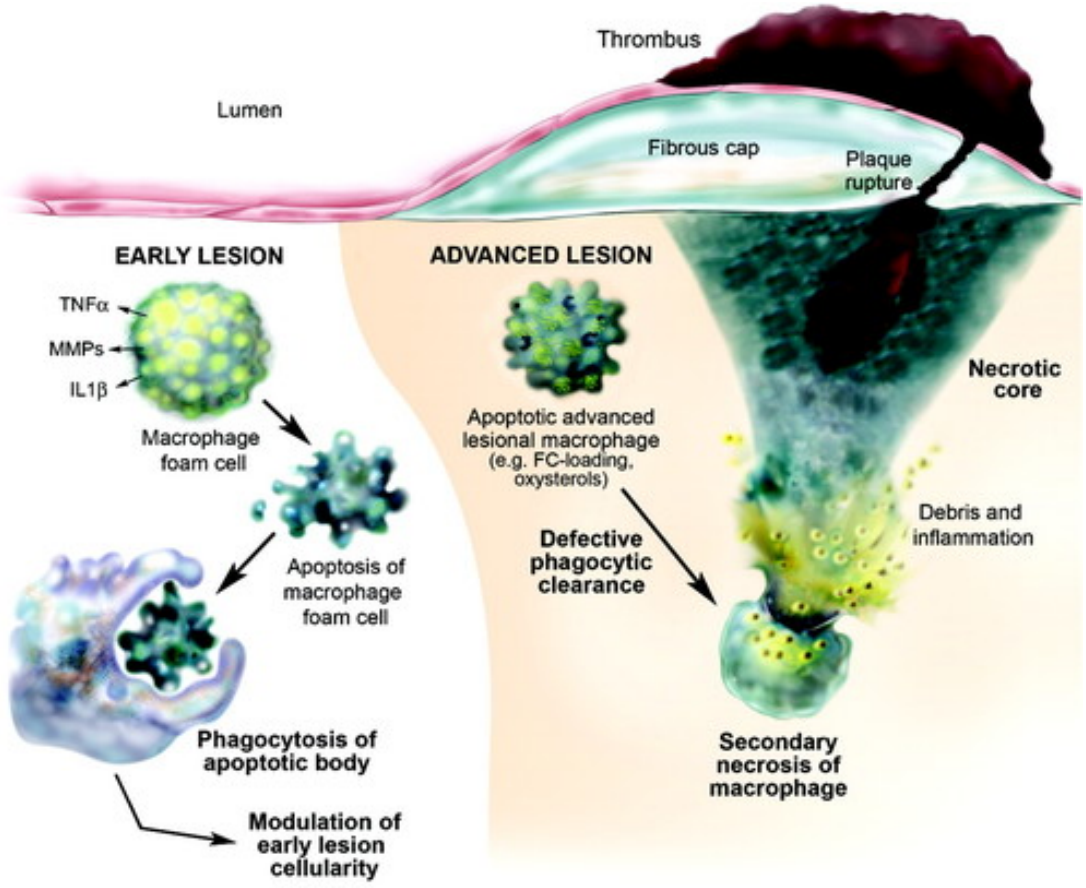


Figure 9: Modèle de la façon dont le stade lésionnel et l'efficacité phagocytaire pourraient déterminer les conséquences de l'apoptose des macrophages dans l'athérosclérose TABAS et al 2005 (98)

Dans les lésions précoces (à gauche), les macrophages de type cellules spumeuses subissent une apoptose et sont ensuite éliminées rapidement et en toute sécurité par les macrophages phagocytaires voisins. Comme les cellules spumeuses vivantes jouent un rôle pro-athérogénique global en sécrétant des cytokines et d'autres molécules, l'apoptose précoce des macrophages lésionnels a pour effet de moduler la cellularité de la lésion et de ralentir la progression de celle-ci. Dans les lésions tardives (à droite), les macrophages subissent également une apoptose, par des mécanismes probablement propres à ces lésions, tels que la charge en cholestérol libre (FC) et l'exposition aux oxystérols. Dans ce contexte, toutefois, la clairance phagocytaire n'est pas efficace et il en résulte une nécrose secondaire des macrophages. Cet événement conduit à la génération du noyau nécrotique, qui favorise l'inflammation, l'instabilité de la plaque et la thrombose lésionnelle aiguë. Le rôle important que jouent probablement les macrophages résiduels dans la promotion de la progression des lésions avancées n'est pas démontré ici.

6.3.2 Imagerie de l'activation plaquettaire et du thrombus

Nous axons ce paragraphe sur les études réalisées en pré-clinique et en clinique concernant l'imagerie moléculaire du thrombus artériel. En effet, il joue un rôle physiopathologique central dans deux pathologies cardio-vasculaires graves : l'anévrysme de l'aorte abdominale (AAA) et l'endocardite infectieuse.

La première validation de l'AnxA5 radiomarquée comme outil d'imagerie moléculaire du thrombus a été réalisée par l'U1148. Ce travail a montré que la fixation du traceur détectée

in vivo sur un modèle d'anévrysme de l'aorte abdominal (AAA) chez le rat, localisée en autoradiographie sur la couche luminale du thrombus mural, était associée en immunohistochimie à l'expression de la PS par les plaquettes activées (*103*). Ces résultats établissaient un lien direct entre le signal obtenu *in vivo* et l'activité de renouvellement du thrombus artériel. Dans le but de valider chez l'homme les résultats obtenus chez l'animal, des thrombi anévrysmaux humains provenant de résections d'AAA ont été incubés dans une solution d'AnxA5 radiomarquée diluée dans un milieu nutritif. La répartition de la fixation du traceur était similaire à celle observée sur les modèles animaux. Ces éléments suggèrent un rôle possible de ce traceur dans la détection et l'évaluation de l'activité biologique des thrombi artériels chez l'homme.

Une deuxième application de l'imagerie du thrombus artérielle a été menée par F Rouzet et al (U1148) sur un modèle d'endocardite infectieuse (*104*). Dans ce travail, la capacité de la scintigraphie à l'Annexine A5 marquée au ^{99m}Tc à fournir une imagerie moléculaire des végétations a été explorée dans plusieurs modèles d'endocardite infectieuse. Cette capacité a été évaluée chez le lapin et le rat en raison des informations distinctes fournies par ces 2 espèces dans un cadre préclinique. Cette étude a permis de conclure que la scintigraphie à la ^{99m}Tc-Annexine A5 est adaptée à l'imagerie moléculaire des végétations fibrino-plaquettaires dans l'endocardite, ainsi qu'à celle des événements emboliques. La captation de ^{99m}Tc-Annexine reflète principalement l'activation plaquettaire se produisant dans la couche luminale des végétations. Cette captation est renforcée par la colonisation bactérienne. Nous détaillerons ultérieurement les phénomènes physiopathologiques impliqués dans l'endocardite infectieuse (*104*).

6.4 L'AnxA5-128

L'AnxA5-128 est une protéine de 36,272 kDa produite par une technique recombinante dans l'Escherchia coli, dans des installations industrielles répondant aux recommandations GMP. Cette forme mutante de l'annexine humaine a été préparée par John Tait (*84,86,87,90*) en rajoutant un site endogène de chélation du ^{99m}Tc à l'extrémité N-terminale. Celui-ci est constitué par six acides aminés (ala-gly-gly-cys-gly-his). Il est suivi par les acides aminés 1-320 de l'AnxA5 humaine. Par ailleurs l'acide aminé cys-316 est muté en sérine, afin de diminuer la possibilité de formation de pont disulfure entre deux molécules d'AnxA5-128 ou au niveau de la même molécule. En effet, avec cette mutation, la seule cystéine restante dans l'AnxA5-128 se situe au niveau de la position 4, dans la partie N-terminale. La chélation du ^{99m}Tc se fait par la formation d'une structure N_3S

sollicitant la cystéine au niveau du N-terminal et l'AA directement adjacent (figure 10). La protéine purifiée est ensuite réduite et stockée pour un marquage ultérieur avec le ^{99m}Tc en utilisant le glucoheptonate.

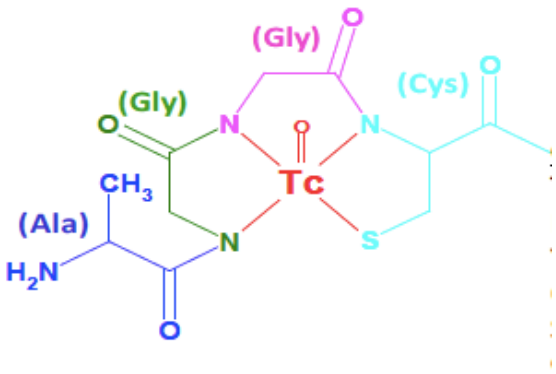


Figure 10: Site de liaison du ^{99m}Tc à l'AnxA5-128

(d'après Atreus pharmaceuticals)

6.4.1 AVANTAGES DE ^{99m}Tc-AnxA5-128 PAR COMPARAISON AUX FORMES PRECEDEMMENT UTILISEES DES ANNEXINES RADIOMARQUEES, EN PARTICULIER LA FORME ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5

Le radio-marquage de l'annexine a été évalué positivement avec de multiples applications cliniques et pré-cliniques dans le domaine de l'oncologie médicale, des pathologies cardiovasculaires et de la rhumatologie. La radiochimie du^{99m}Tc est compliquée et peut être considérée comme l'un de ses inconvénients. Contrairement aux halogènes, tels que ^{123}I et le ^{18}F, il n'est pas possible de lier un atome de technétium à un atome de carbone, d'azote ou d'oxygène. Par conséquent, le technétium exige une étape de conjugaison plus complexe pour attacher l'atome aux molécules bioactives. Cette conjugaison a été obtenue par l'utilisation d'agents chélatants bifonctionnels. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour marquer l'AnxA5: liaison ester (MAG3, dithiolate), des liaisons amides (hydrazinonicotinamide [HYNIC]) et des liaisons thiolates (iminothiolane) (*107*).

Luo et al (*107*) ont réalisé un marquage direct par réduction des groupes thiols libres de la protéine en présence d'ions stanneux et de citrate (*107*). Après incubation, les rendements et la pureté radiochimiques rapportés sont >95%, et la stabilité du marquage *in vitro* est de 10h. Cependant, comme l'AnxA5 ne possède qu'un résidu cystéine enfoui dans sa structure tertiaire, une faible activité spécifique est à prévoir.

Le premier essai clinique mené par Belhocine et al. (*108*) réalisé avec l'AnxA5 a été conduit chez les patients souffrant d'un cancer pulmonaire afin d'évaluer la réponse à la chimiothérapie (*109*). C'est la forme AnxA5 marquée au ^{99m}Tc-pertechnetate à l'aide du penthioate radioligand (N_2S_2) (*107*,*110*).

Une amélioration de la méthode de marquage basée sur l'agent bifonctionnel l'hydrazinonicotinamide (HYNIC) a été sélectionnée pour plusieurs études pré-clinique, chez des volontaires sains et enfin pour des études cliniques (*111*). Tout comme la méthode N_2S_2 et le kit BTAP-AnxA5 (*109*,*112–116*), la ^{99m}Tc-HYNIC–AnxA5 a montré une captation rénale, hépatique et vésicale mais sans mise en évidence d'excrétion biliaire. Plusieurs essais ont confirmé l'utilité de HYNIC–AnxA5 dans la détermination de l'efficacité de la chimiothérapie (*79-82*), et de la réponse thérapeutique dans un modèle murin (*118*).

Malgré ces résultats prometteurs avec ces agents d'imagerie, ces développements sont gênés par une captation rénale, hépatique et splénique. Une telle biodistribution peut potentiellement interférer avec la détection d'apoptose dans ces organes.

Afin de s'affranchir de cette limite, plusieurs groupes ont développé des molécules alternatives de l'AnxA5 radiomarquée, incluant l'utilisation de mutants d'annexines ayant un site endogène de chélation du ^{99m}Tc. Nous citons comme exemples l'AnxA5-117 (*106*) et l'AnxA5-128 (*85,86*).

Les AnxA5-117 et A5-128 ont des avantages en comparaison à la forme HYNIC-AnxA5, incluant une diminution de 50 à 75% de la captation rénale et une amélioration remarquable de la localisation *in vivo* des sites d'apoptose dans un modèle animal (*105*). Il a également été montré que l'utilisation de cette forme mutée de l'annexine nécessite les quatre sites calciques pour une liaison totale de l'annexine *in vitro* ou *in vivo*. Une mutation ou une diminution de la fonction de n'importe quel site de liaison calcique décroit *in vivo* la fixation du traceur de 25% et l'altération de n'importe quel site de liaison calcique peut engendrer une dégradation de 50%.

Un autre travail a établi qu'une modification aléatoire du résidu lysine de l'AnxA5 par les groupements HYNIC, mercaptoacetyltriglycine (MAG_3), ou isothiocyanate de fluorescéine

(FITC), engendre une diminution de 50% de la captation hépatique du traceur en comparaison aux protéines possédant un site endogène de chélation.

Des études précliniques chez les souris ont montré qu'à 1h post injection, il reste seulement 6-8% de l'activité injectée (AI) de la ^{99m}Tc-AnxA5-128 au niveau rénal contre 45-50% de l'AI pour ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5 (*88*). De plus, le rapport signal sur bruit au niveau des cibles apoptotiques est doublé avec la ^{99m}Tc-AnxA5-128.

Il a également été démontré que l'AnxA5 est très thermolabile et perd la majeure partie de son activité à 56°C pendant 10 minutes (tout en étant assez stable à 37°C), ce qui exclut l'utilisation de nombreux types de chimie de marquage.

6.4.2 AnxA5-128 : LE PRINCIPE PHARMACEUTIQUE ACTIF (IPA) ET LA SUBSTANCE PHARMACEUTIQUE

Le médicament proposé est constitué d'un kit de préparation du ^{99m}Tc-AnxA5-128, contenant l'AnxA5-128 comme l'ingrédient pharmaceutique actif, qui sera radio-marquée par le ^{99m}Tc avant injection afin de donner ^{99m}Tc-AnxA5-128.

La production de l'annexine comme substance médicamenteuse passe par plusieurs étapes : fermentation (processus en amont : production, récupération de la biomasse et homogénéisation) suivie d'une étape de purification (étape d'aval), qui est réalisée en plusieurs étapes, à travers plusieurs colonnes chromatographiques. A la fin du processus, 1mg/ml d'une solution d'AnxA5-128 est obtenue. Elle sera aliquotée d'une manière aseptique sous une atmosphère de N2, après une filtration stérile (filtre de 0,22µm).

Ce produit, lyophilisé et stérile, est fourni sous forme de kit à flacon unique afin d'être reconstitué avec une solution de ^{99m}Tc élué par un générateur. Un flacon d'une dose unique contient 0,4 mg d'AnxA5. Le kit contient également du chlorure stanneux (agent réducteur), du dihydrate α-D-glucoheptonate (agent trans chélateur), de l'acide gentisique (protecteur de la radiolyse), du métabisulfite de sodium (agent antioxydant) de l'hydroxypropyl-beta-cyclodextrine (agent de solubilisation) et du dihydrate de trehalose (cryoprotecteur et agent de charge). L'acide lactique est utilisé en tant que tampon.

Le flacon à dose unique est conçu pour être reconstitué avec 2 mL ± 0,2 mL contenant jusqu'à 740 MBq ± 74 MBq (20 mCi ± 2 mCi) de ^{99m}Tc et il est prévu qu'il soit administré dans les 6 heures suivant la reconstitution (stabilité de marquage).

Une étude clinique de phase I sur l'innocuité, la tolérance, la pharmacocinétique et l'imagerie du ^{99m}Tc-AnxA5-128, a été menée au Canada chez 12 volontaires adultes sains.

Aucun effet indésirable significatif lié au médicament de l'étude n'est survenu. Il n'y avait aucun changement significatif dans toutes les variables cliniques et biologiques étudiées.
La biodistribution permet l'analyse des images dans toutes les régions du corps à l'exception des organes ayant une absorption significative (reins, foie, rate et vessie), en particulier au niveau des sites musculo-squelettiques et cardiovasculaires. L'imagerie est possible à partir d'1 à 2 heures après l'injection intraveineuse du radio traceur.
Le marquage simple de ce nouveau dérivé de l'annexine avec le ^{99m}Tc, les bons résultats de la pureté radiochimique et la fabrication d'un kit d'AnxA5-128 de qualité GMP, ont fait l'objet d'un processus d'agrément pour une utilisation humaine aux États-Unis et en Europe (Atreus pharmaceuticals, Ottawa, ON)

CHAPITRE 2 : EVALUATION DE RADIOLIGAND DE LA PS DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

1. OBJECTIFS

Ce travail de thèse constitue une continuité de la recherche de notre équipe dans le domaine de l'imagerie du thrombus, en particulier de l'imagerie de la PS, par plusieurs approches différentes. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à tester une approche peptidique de l'imagerie de la PS. Pour ceci, nous avons initié une collaboration avec le laboratoire Guerbet qui développe un peptide ayant une affinité pour la PS de l'ordre de 10^{-8} M. Ce peptide a le potentiel d'être marqué avec un émetteur de positon le ^{68}Ga, permettant ainsi une imagerie de la PS par TEP. Ainsi, dans l'objectif de développer des traceurs pour une application clinique ou préclinique en imagerie TEP, l'équipe de médecine nucléaire de Bichat Claude Bernard, dont le centre est dépourvu de cyclotron a opté pour l'utilisation du ^{68}Ga, accessible à partir d'un générateur dont l'utilisation est possible pendant une période d'au moins une année. Nous présenterons et discuterons les résultats de cette approche.

Par ailleurs, notre travail a consisté à valider tant en pré-clinique qu'en clinique un ligand d'imagerie moléculaire protéique radiomarqué ciblant la phosphatidylsérine, avec une affinité de 10^{-9} M. Ce ligand est développé par le laboratoire de radiopharmacie Advanced Accelerator Applications (AAA). Il s'agit de kits d'un variant de l'Annexine, répondant aux normes GMP, destiné au radio-marquage par le ^{99m}Tc (AnxA5-128). L'utilisation clinique originale proposée concerne la détection du thrombus, en particulier du thrombus infecté tel que rencontré dans l'endocardite infectieuse. Nous présentons les résultats du volet pré-clinique et la validation radio-pharmaceutique. Ensuite nous présenterons les différentes étapes de la translation clinique ainsi que les résultats de la première phase de cette étude clinique concernant la tolérance et les résultats préliminaires de preuve de concept chez les dix premiers patients suspects d'endocardite infectieuse.

2. APPROCHE PEPTIDIQUE DE L'IMAGERIE DE LA PHOSPHATIDYL SERINE

L'objectif principal de cette approche c'est d'essayer d'aboutir à une imagerie TEP de la phosphatidylsérine en utilisant le marquage d'un peptide (les avantages du ligand

peptidique ont été précisés au paragraphe 4 du chapitre 1 de la partie introduction) par un émetteur de positons.

2.1 LIGAND PEPTIDIQUE DE LA PS ET IMAGERIE TEP : ^{68}GA-P04087

Afin de développer un traceur peptidique de PS pour l'imagerie TEP, notre équipe s'est intéressée aux peptides isolés par technique de phage display par Burtea et coll (*50*) :

Peptide	Séquence peptidique	CI_{50} (M)
R824	PGDLSR	$1{,}33.\ 10^{-8}$
R825	DAHSFS	$8{,}16.10^{-7}$
R826	LIKKPF	$1{,}48.10^{-8}$

L'affinité a été déterminée par compétition de ces peptides avec l'AnxA5.

Une collaboration de La société GUERBET et de notre équipe INSERM dans le cadre du projet IMOVA (Imagerie Moléculaire Vasculaire de l'Athérothrombose), un projet translationnel d'imagerie dont l'objectif était de développer et valider jusqu'à chez l'Homme en phase 0 de nouveaux produits d'imagerie moléculaire de l'athérothrombose en associant les complémentarités des différentes techniques d'imagerie IRM, SPECT et TEP), a permis la réalisation des études de stabilité de ces peptides vis-à-vis de la dégradation protéolytique (études Guerbet, DR-11-00882-RAP; Guerbet, DR-12-00563-RAP; Guerbet, DR-12-00580-RAP).

Nous avons utilisé le peptide retenu sur la base des données de stabilité et d'affinité à la PS pour la synthèse du vecteur en imagerie TEP. Un bras espaceur (β-alanine) a été ajouté au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide sélectionné et a servi à la conjugaison au NODAGA, un chélateur du gallium. Le composé ainsi obtenu est le P04087. Après complexation du gallium, l'affinité du composé Ga-P04087 a été évaluée par ELISA en compétition avec l'Annexine A5. L'ensemble de ces opérations a été effectué par Alexandre Guez de l'Université Pierre et Marie-Curie. La suite du travail de mise au point de marquage au gallium 68, gallium 67 et de caractérisation du produit *in vitro* a été effectué à Bichat Claude Bernard par Dr Rana Benazzouna. Nous avons ensuite entamé une caractérisation *in vivo* sur un modèle d'endocardite expérimentale chez le rat (imagerie du thrombus infecté). Cette étude *in vivo* s'est basée uniquement sur le marquage du peptide avec du ^{67}Ga, et ce en raison de sa demi-vie plus longue (3 jours) vs seulement 68 min pour le ^{68}Ga. Ceci rend possible la réalisation d'images tardives et des autoradiographies, afin de mieux étudier et de localiser en imagerie et en histologie le signal scintigraphique.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans la revue *EJNMMI Radiopharm Chem.* (*120*)

Ben Azzouna *et al. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* (2017) 2:3
DOI 10.1186/s41181-016-0021-5

EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry

RESEARCH ARTICLE Open Access

Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, a functionalized phosphatidylserine-binding peptide

Rana Ben Azzouna[1,2,3*], Alexandre Guez[4], Khadija Benali[1,2,3], Faisal Al-Shoukr[1,2,3], Walter Gonzalez[5], Philippe Karoyan[4], François Rouzet[1,2,3] and Dominique Le Guludec[1,2,3]

* Correspondence: rana.benazzouna@gmail.com
[1]Nuclear Medicine Department and DHU FIRE, Bichat-Claude Bernard University Hospital, AP-HP, Paris, France
[2]UMR 1148 Inserm, Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Background: Radiolabeled phosphatidylserine (PS)-binding peptides represent an innovative strategy for molecular imaging of apoptosis and thrombus. The hexapeptide PGDLSR was described as a selective and high affinity ligand for PS. In this work, we synthesized and evaluated a gallium labelled-PGDLSR peptide as a potential and selective radiopharmaceutical for nuclear imaging. PGDLSR-β-alanine-NODAGA (P04087) was prepared using Fmoc-based synthesis and then chelated with cold gallium, ^{68}Ga and ^{67}Ga. The affinity of Ga-P04087 for PS was evaluated by a competitive binding assay using biotinylated AnnexinV. The in vitro stability of the radiotracer was checked at room temperature and after incubation in human serum at 37 °C with and without a metalloprotease inhibitor. The in vivo binding of ^{67}Ga-P04087 to phosphatidylserine was evaluated in a rat model of infective endocarditis.

Results: PGDLSR was successfully prepared with a yield of 31%. P04087 was obtained with a yield of 28% and in high chemical purity (>95%). The radiochemical purities of ^{67}Ga-P04087 and ^{68}Ga-P04087 exceeded 98% in all cases. IC50 of P04087 and Ga-P04087 were in the same order of magnitude (10^{-7}M). The radiolabelled product was stable for 24 h at room temperature, but was very rapidly degraded in human serum in the absence of a protease inhibitor, which had a stabilizing effect. No focal uptake could be detected visually in the cardiac area on SPECT images. On autoradiography however, a focal uptake of ^{67}Ga-P04087 in the valve area was present and histological slices demonstrated localization of peptide binding at the peripheral layer of vegetations.

Conclusion: In spite of the preservation of the peptide affinity to the PS after its conjugation to the NODAGA chelator, and of the presence of ^{67}Ga-P04087 uptake on autoradiography, the absence of detectable foci in vivo in the valve area may be attributed to both the low intensity of the signal and the presence of background activity originating from blood pool and surrounding tissues in the living animals. Further modifications are necessary to design a radiolabeled peptide with higher binding potencies to PS while possessing enhanced metabolic stability in vivo.

Keywords: Phosphatidylserine, Peptide, NODAGA, Gallium, PGDLSR, Infective endocarditis

Springer Open

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Background

The plasma membrane (PM) of a healthy cell generally exhibits an asymmetric distribution of its major phospholipids. Typically, the inner PM leaflet contains essentially all phosphatidylserine (PS), most phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI), with sphingomyelin (SM) largely confined to the outer leaflet, and phosphatidylcholine (PC) distributed equally between both leaflets. (van Meer 1993); (Martin et al. 1995).

Apoptosis induces redistribution of membrane phospholipids of the cell. In fact, apoptosis, is accompanied by changes in PS distribution at the PM (Martin et al. 1995). PS, being usually constitutive of inner leaflet of the membrane, is then exposed on the outer leaflet. PS exposure is widely considered to be an early marker of apoptotic cell death. (Galluzzi et al. 2012), (Kroemer et al. 2009).

PS externalization precedes several other events (such as loss of membrane integrity…) normally associated with this mode of cell death (Martin et al. 1995). This phenomenon allows the recognition of apoptotic cells by macrophages and their phagocytosis.

Furthermore, in erythrocytes and platelets, PS is normally restricted to the inner leaflet of the bilayer. When platelets are activated or erythrocytes are loaded with Ca^{2+}, PS transversely moves across the bilayer to the outer leaflet of the plasma membrane, generating an active surface for assembly of the coagulation factors Va and Xa into the prothrombinase complex (Verhoven et al. 1995). PS exposure occurs also in T-cell activation, without cell death (Kroemer et al. 2009).

PS is accessible to a potential ligand only during the apoptotic process, platelet or T-cell activations (Rouzet et al. 2009), providing an abundant molecular target for the detection of cellular injury.

Several ligands were developed as molecular imaging agents of PS. Annexin V, the endogenous ligand of PS (Andree et al. 1990), was successfully evaluated as a molecular imaging agent of apoptotic cells (Blankenberg et al. 1998) as well as thrombus (Sarda-Mantel et al. 2006), with many potential clinical applications in oncology, cardiovascular diseases, and rheumatology (Boersma et al. 2005).

Annexin V and all protein-ligands (such as synaptotagamin I) that bind to phospholipids in cell membranes (Jung et al. 2004) have however many drawbacks, i.e. the cost of production, their antigenicity, and the restrained diffusion to the targeted sites due to their larger size. (Burtea et al. 2009). Moreover, the high liver and kidney uptake levels of Annexin V lead to low target-to-background ratios (Wuest et al. 2015).

In order to overcome these disadvantages, peptide based approaches represent a promising alternative. Indeed, peptides mimicking protein secondary structures, can bind to proteins with high affinity. As a result, they can serve as agonists, antagonists and allosterics modulators for many receptors and they also have a lower toxicity than small molecules. (Craik et al. 2013), (Bhat et al. 2015), (Tsomaia 2015). Their major drawbacks remain the poor overall properties regarding metabolic stability, oral bioavailability, membrane permeability and conformational stability, limiting their selectivity with the target.

Nevertheless, they have an affordable synthesis and can incorporate a wide variety of functional groups. A new generation of therapeutics peptides has emerged, increasing their conformational stability and their pharmacokinetics properties. (Wójcik and Berlicki 2016).

With this aim in mind and as a valuable alternative to protein-ligands, Burtea et al. provided PS-specific peptides identified by phage display technology that bind targets with high affinity and specificity: R824 (PGDLSR, $IC_{50} = 1.33 \times 10^{-8}$M), R825 (DAHSFS, $IC_{50} = 8.16 \times 10^{-7}$M) and R826 (LIKKPF, $IC_{50} = 1.48 \times 10^{-8}$M) (Burtea et al. 2009).

Thus, if labelled with a suitable radioisotope, these peptides might provide a convenient imaging tool. The ^{68}Ga has a very favourable positron emission (1880 keV, 90%) for PET imaging, and a short half-life (68 min) suitably matched for imaging with peptide vectors. (Price and Orvig 2014). The availability of ^{68}Ga from a ^{68}Ge/^{68}Ga generator (^{68}Ge $t_{1/2} = 270$ days) allows hospitals low-cost access to a PET isotope without expensive cyclotron facilities (Ma et al. 2016), (Velikyan 2013).

Herein, after the Fmoc synthesis, the stability study of the three peptides and the selection of the most suitable one, we describe the conjugation of the selected peptide with a metal chelator, the characterization of the functionalized peptide and its radiolabelling with ^{68}Ga and with ^{67}Ga, a longer-lived isotope of gallium which can be a more suitable tool for preclinical investigations when developing a new Ga-radiotracer.

Methods

Synthesis of R824 (PGDLSR), R825 (DAHSFS) and R826 (LIKKPF)

Loading of the first amino acid on 2-chlorotrityl resin

Fmoc-protected amino acids were obtained from commercial suppliers (Senn Chemicals, Iris Biotech GmbH, Fluka, and Novabiochem). The first Fmoc-protected amino acid was loaded on the 2-Cl-trityl resin (Iris Biotech GmbH).

A solution of the Fmoc-Amino Acids (0.3-1.2 eq. relative to the resin, depending on the final loading expected) and Diisopropylethylamine (DIPEA) (4 eq. relative to the Fmoc-amino acid) in dichloromethane (DCM) (10 mL per gram of resin) was added to the DCM-swollen resin. The suspension was shaken at room temperature for 2 h, then washed with a mixture of DCM, methanol (MeOH) and DIPEA (17:2:1, 3×), DCM (3×), dimethylformamide (DMF) (3×), MeOH (3×), and dried in vacuo.

Synthesis was performed on a 0.25 mmol scale.

Peptide coupling

The resin-linked peptide was swollen with N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and then was treated with a solution containing the Fmoc-protected amino acid (5 eq.), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (5 eq.), N-hydroxybenzotriazole (HOBt) (5 eq.) and DIPEA (10 eq.) in NMP (10 mL per gram of resin). The suspension was shaken for a duration extending from 30 min to a whole night depending on the amino acid that was used.

For removal of the N-terminal Fmoc groups, the resin was first treated with a 20% solution of piperidine in NMP for 3 min and subsequently with a 20% solution of piperidine in NMP for 15 min. Finally, the resin was washed with NMP.

The completion of the reaction is monitored by a Kaiser test (Kaiser et al. 1970).

Simultaneous cleavage and deprotection of peptide

The resin was treated with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)-H_2O- triisopropylsilane (TIS), 95:2.5:2.5 and shaken at room temperature for 2 h. After removal of the volatile compounds under reduced pressure, the fully deprotected peptide was precipitated by

addition of pre-cooled diethyl ether (Et_2O) and centrifuged for 5 min at 6,000 rpm. The ether was decanted and the same operation was repeated twice. The crude product was lyophilized and finally purified by preparative RP-HPLC using a C18 column. Purity was determined by analytical RP-HPLC on linear gradient 5 to 35% of CH_3CN (0.1% TFA) in H_2O (0.1% TFA) in 30 min.

Quality control of the prepared peptides

Peptides were characterized by MALDI-TOF Mass Spectrometry (DE-Pro, PerSeptive Biosystems) in positive ion reflector mode using the matrix α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid. The m/z of the protonated molecule (first isotope) are given as theoretical (calculated), experimental (found).

Selection of the peptide-candidate to be developed as a nuclear contrast agent

A 100 μL solutions of R824 (PGDLSR), R825 (DAHSFS) and R826 (LIKKPF) in Hank's medium and 10% FCS (foetal calf serum) were prepared and incubated (in triplicate) for 2 h at 37 °C and in complete darkness. At 0, 1 h and 2 h, 100 μL were sampled from each tube; 200 μL of 0.6 M trichloroacetic acid were added. The mixtures were then centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. One microliter of each supernatant was then analyzed by LC/ES/MS.

Synthesis of P04087

R824-β-alanine was firstly prepared as described above.

The NODAGA chelator was conjugated directly to the peptide R824 resin bound via a spacer (beta-alanine). Coupling of NODAGA was performed with only 3 equivalents of HBTU, HOBt and 6 equivalents of DIPEA as detailed in Fig. 1.

Synthesis of cold gallium-P04087

P04087 was chelated with cold gallium as described in Fig. 2. Gallium (III) chloride (^{nat}Ga) was purchased from Sigma-Aldrich.

P04087 peptide (18 mg, 14 μM) in 2 mL of an acetic acid and sodium acetate buffer (pH = 5.0) was incubated with 31 μL of a gallium (III) chloride 0.5 M solution (1.1 eq.),

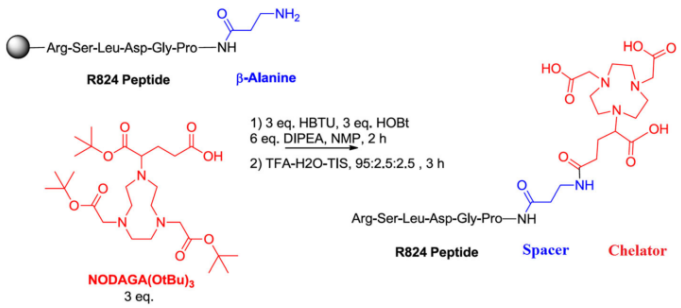


Fig. 1 The coupling of R824-β-Alanine and NODAGA

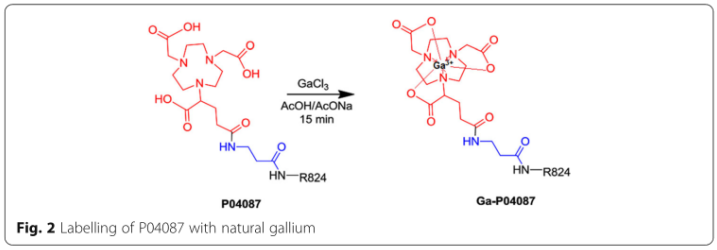


Fig. 2 Labelling of P04087 with natural gallium

for 15 min at room temperature. Following this incubation period, the sample was directly injected into a q-TOF mass spectrometer.

The quantification of the labeling was determined by calculating the relative peak height of the molecular masses corresponding to the chelated and unchelated peptide.

The purification unit consisted of a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, 1 g C18). The C18 was conditioned with 1 mL of absolute ethanol followed by 3 mL deionized water. The reaction mixture was transferred to the C18 cartridge. After adsorption, the cartridge was washed by 2.5 mL of deionized water (in order to wash out residual unreacted $GaCl_3$) and then, the purified product was eluted by 2 mL of a mixture acetonitrile/water (1:1). The resulting solution was then dried on a rotary evaporator, mixed with 5 mL of H2O, frozen at −78 °C and subsequently lyophilized overnight.

Affinity study

Affinities of cold-labelled peptide (Ga-P04087) and the peptide of reference (R824) for phosphatidylserine were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. A competitive binding assay procedure was performed: A 96-well plate (MICROLON plaque 200, med. Binding, F-bottom, GREINER) was coated with 200 µL/well of phosphatidylserine (PS) (Avanti Polar Lipids) (dissolved in ethanol (SIGMA ALDRICH) for a final concentration of 100 µg/mL). The lipids were dried overnight at room temperature under a ventilation hood, and the plate was washed three times with Ca^{2+}-Tween-20 0,05 buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 0.05% Tween-20) to remove any nonbinding lipids. Next, Blocking Solution (300 µL) (Protein-Free (TBS) and Blocking Buffer from Thermo Fisher Scientific) were added to each well, and the plates were incubated at room temperature for 1 h on a shaker to block nonspecific binding. Wells were washed with Washing Buffer for 5 min (this being done twice). Serial dilutions of peptides (from 0.01 nM to 1 µM) in Ca^{2+} Buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4) were incubated at 37 °C for 30 min with PS immobilized on microtiter plates. The competitor (biotinylated AnnV: Annexin V-Biotin Reagent from CLINISCIENCES) was then added at a concentration equal to its Kd for PS (5×10^{-10} M) and incubated for 1 h 30. After rinsing with Ca^{2+} buffer, the binding between AnnV-Bt and the target was detected by adding the ABC Standard Peroxidase Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) (200 µL) for more than (over) one hour at room temperature. The staining reaction was developed with 200 µL/well of ABTS (22 mg ABTS (SIGMA ALDRICH) in 100 mL of 50 mM sodium citrate, pH 4.0 completed with 0.05% H_2O_2 (SIGMA ALDRICH). OD405 values were measured using a microplate reader StatFax-2100.

and van Lier 1993).

The radiochemical purity of the gallium chloride solution was tested by radio-thin layer chromatography using ITLC-SG (PALL), mobile phase: (0.4 M sodium acetate pH 4 which was prepared using sodium acetate trihydrate BioUltra ≥ 99.5%, sigma-aldrich, Germany, Water TraceSELECT®, Fluka Analytical. Sigma-Aldrich – Switzerland. pH was adjusted by addition of acetic acid ≥99.99%, Sigma-Aldrich).

Retention was expressed as % of trapped ^{67}Ga on the silica cartridge from the total ^{67}Ga-Citrate activity passed through the column. Desorption was expressed as % eluted ^{67}Ga of total ^{67}Ga activity trapped on the column.

The recovery yield was expressed as % of eluted ^{67}Ga from the total ^{67}Ga-citrate solution activity passed through the silica cartridge.

^{67}Ga activity was counted with an ionization chamber (scintidose, LemerPax).

Radiolabelling of P04087 with gallium 67

Sixty five μL of 1 mg/mL P04087 solution in 0.4 M sodium acetate pH 4.6 were mixed with 500 μL of the same buffer (Eur. Pharmacopeia buffer) and the $^{67}GaCl_3$ solution, prepared as described above (activities from 143 to 264 MBq). The preparation was incubated for 5 min at room temperature.

The End of Synthesis (EOS) activity was measured by means of a calibrated radionuclide activity meter (Scintidose, LemerPax).

Stability of the gallium radiotracer

The stability of the radiolabelled peptide was checked at room temperature first 4 h and then 24 h after the end of radiolabelling by HPLC using the gradient described above.

The metabolic stability was checked in human serum at 37 °C in presence and in absence of 1,10 phenanthroline monohydrate, a well-known metalloprotease inhibitor (Wijayanti et al. 2006) at appropriate periods of time (0, 15, 30, 60 min).

In two different tubes containing 200 μL of human serum plasma previously incubated at 37 °C was added 40 μL of ^{67}Ga-P04087 labelling solution. 4 μL of 1 mg/mL of 1,10 phenanthroline monohydrate in ethanol was added only in one of the two tubes.

At 0, 15, 30 and 60 min, 20 μL aliquots were collected and proteins were precipitated with 200 μL of methanol. Samples were then filtered with 0.2 μm Whatman filter (13 mm) and the methanol was then evaporated with a stream of nitrogen.

The resulting dry residue was dissolved in 200 μL water and then analyzed by C18-radio-HPLC using the equipment mentioned above.

The in vivo binding to phosphatidylserine

We evaluated the in vivo binding of ^{67}Ga-P04087 to PS in a rat model of infective endocarditis. This model was selected because we previously evidenced the high expression of PS in valve vegetations in relation with platelets activation (Rouzet et al. 2008). The procedures and animal care complied with the principles of animal care formulated by the National Society for Medical Research. This study was conducted under authorization of the French Direction of the Veterinary Services (No. 75–214) and the approval of the Animal Ethics Committee of our Institution. Infective endocarditis was induced in three males Wistar rats (Janvier, France) as described

Table 3 MS analysis of P04087 peptide

Compound	Peptide sequence	Molecular mass	
		Calculated	Found
P04087	NODAGA-βAla-PGDLSR	1072.5	1072.4

conditions at a temperature of 37 °C. The R824 hexapeptide was selected for further investigations in the design of a contrast agent suitable for nuclear imaging, because of its higher PS affinity compared with R825 (Burtea et al. 2009).

Synthesis of R824-β-alanine-NODAGA (P04087)

R824 peptide (PGDLSR) was successfully prepared using the Fmoc-based synthesis (31% yield). The NODAGA chelator was conjugated to the peptide R824 via a spacer (beta-alanine) at the N-terminus. After purification, the NODAGA conjugated peptide (P04087) was obtained as a white powder with a yield of 28% and in high chemical purity (>95%).

Molecular masses were verified by mass spectrometry (Table 3).

Cold labeling of P04087 peptide with ^{nat}Gallium (III) chloride

Cold gallium labelling was successfully performed to provide Ga-P04087.

HPLC chromatograms of P04087, Ga-P04087 and a mixture of the two compounds are given in Fig. 3.

Affinity study

The affinities of (Ga-NODAGA-ßAla-R824) and R824 were evaluated by ELISA. (Fig. 4). The annexin V concentration was stable. Concentrations of tested compounds were

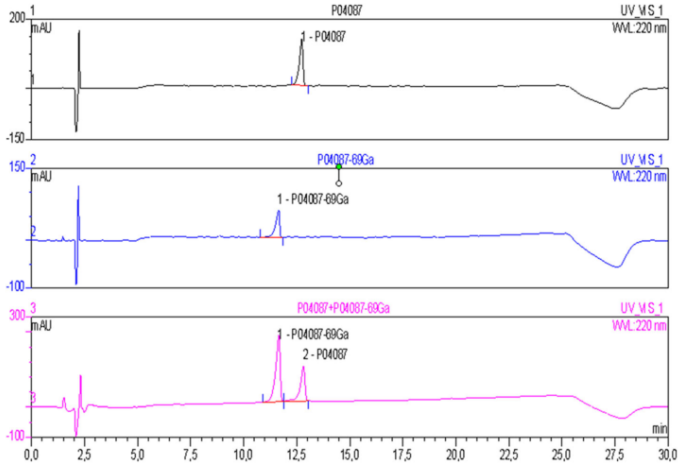


Fig. 3 HPLC chromatograms of (**1**) P04087 (RT = 12.7), (**2**) Ga-P04087 (RT = 11.7) and (**3**) a mixture (P04087/Ga-P04087)

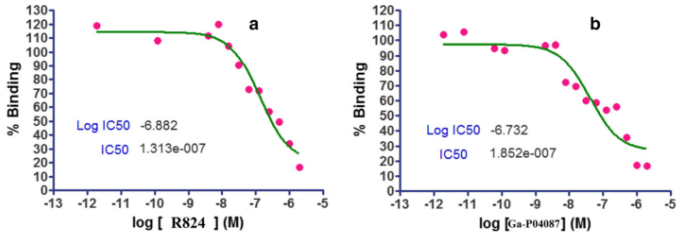


Fig. 4 Phosphatidylserine saturation by (**a**) R824 peptide, (**b**) the Ga-P04087 tracer. When Annexin V is present without competitor, the signal is considered as reference and is equal 100%

increased from 0.01 nM to 1 μM. The IC_{50} of R824 ($1.313x10^{-7}$M)) and Ga-P04087 (1.852×10^{-7}M) were in the same order of magnitude. Thus, the chemical modifications (the addition of a spacer, a chelator and Ga) did not alter the affinity of R824 to its target, i.e. the PS.

Radiolabelling

The preparation of [67] gallium chloride from [^{67}Ga]-Citrate

Five preparations of gallium chloride were performed. Prior to each preparation, radiochemical purity of gallium citrate solution was controlled with ITLC-SG using 0.4 M sodium acetate (pH 4) as mobile phase. A typical radiochromatogram is shown in Fig. 5.

The volume of citrate solution that passed through the silica cartridge ranged from 0.84 to 3 mL and activities were from 131 to 517 MBq. The details of the experiments are shown in Table 4.

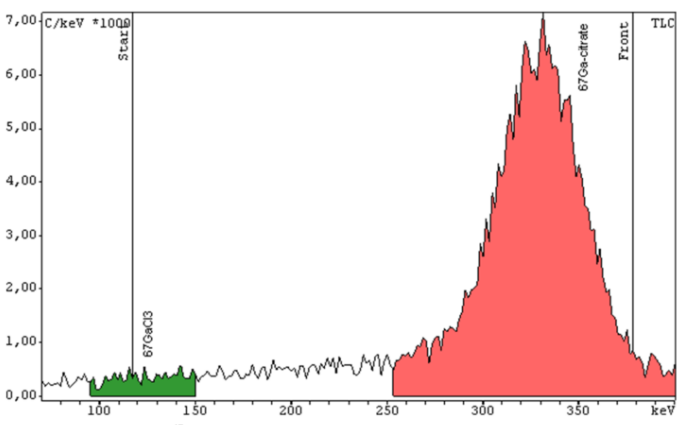


Fig. 5 Radio-ITLC-SG of the ^{67}Ga-citrate solution purchased from iba molecular. Mobile phase: 0.4 M sodium acetate pH 4. Rf (67Ga-citrate) = 1

Table 4 Details of preparation of gallium chloride solution from gallium citrate solution

^{67}Ga-citrate volume (mL)	67Ga-Citrate activity (MBq)	67Ga activity trapped in silica cartridge (MBq)	Retention yield (%)	Eluted activity (MBq)	Desorption yield (%)	$^{67}GaCl_3$ recovery yield (%)	RCP (%)
0.9	150.8	134.8	89.39	131.65	97.66	87.3	99.6
0.84	124	104.9	84.60	102.3	97.52	82.5	99.83
1	173.2	151.6	87.53	148.6	98.02	85.8	98.38
1	159.6	142.9	89.54	141.46	98.99	88.63	99.99
3	503.24	475.5	94.49	468.7	98.57	93.14	99.89
		Average ± SD	89.11 ± 3.61		98.15 ± 0.62	87.47 ± 3.90	99.54 ± 0.66

Radiochemical purity, as determined by instant thin-layer chromatography (Fig. 6), exceeded 99% in all cases; the obtained gallium chloride solutions can be used for radiolabelling.

The radiolabelling of P04087

The results of the radiolabelling of P04087 with gallium 68 are shown in Table 5.

The results of the radiolabelling of P04087 with gallium 67 are shown in Table 6.

The radiochemical purities were checked by radio-HPLC. Typical radio-chromatograms are shown in Fig. 7.

The stability of ^{67}Ga-radiotracer

The radiochemical stability of the final radiolabelled product:

The radiochemical purity was checked at room temperature 24 h after the end of the labeling and was 99.60 ± 0.35%. No radiolysis breakdown products were observed, thus highlighting the stability of the final radiolabelled ^{67}Ga-radiotracer.

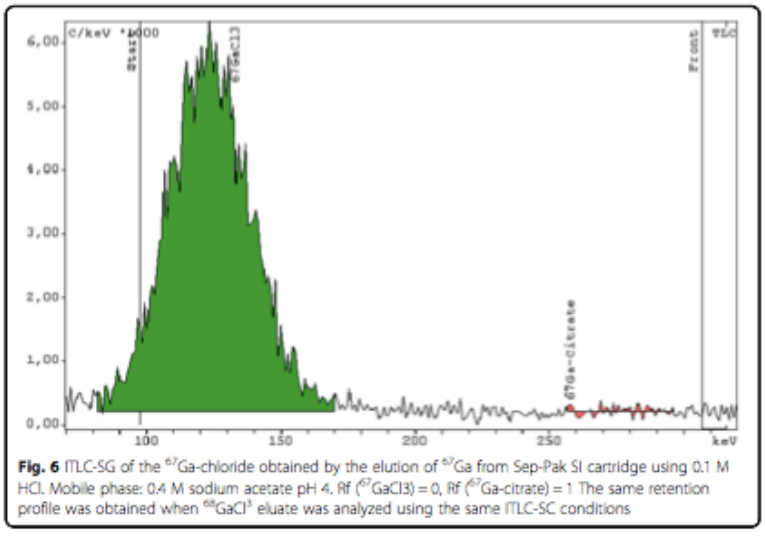


Fig. 6 ITLC-SG of the ^{67}Ga-chloride obtained by the elution of ^{67}Ga from Sep-Pak SI cartridge using 0.1 M HCl. Mobile phase: 0.4 M sodium acetate pH 4. Rf (^{67}GaCl3) = 0, Rf (^{67}Ga-citrate) = 1 The same retention profile was obtained when $^{68}GaCl^3$ eluate was analyzed using the same ITLC-SC conditions

Table 5 Average results of three productions of ^{68}Ga-P04087 conjugated peptide

Parameter	Test method	Average ± SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	99.53 ± 0.81
pH	pH meter	4.37 ± 0.32

The stability in human serum

The in vitro stability of the radiolabelled peptide was evaluated in human serum at 37 °C. As shown in Fig. 8, without metalloprotease inhibitor, the radiolabelled peptide was quickly degraded. In contrast to that rapid degradation, the addition of a suitable amount of 1.10 phenanthroline monohydrate had a stabilizing effect (the 100% radiochemical purity remained stable throughout the study).

The in vivo binding to phosphatidylserine

No focal uptake could be detected visually in the cardiac area on SPECT images (Fig. 9). On autoradiography however, a focal uptake of ^{67}Ga-P04087 in the valve area was present (mean vegetation to remote myocardium ratio: 3.2). Comparative analysis of autoradiography and histological slices demonstrated localization of peptide binding (whatever the tracer) at the peripheral layer of vegetations, corresponding to the recruitment of activated platelets from the blood pool (Fig. 10: Comparative analysis of autoradiography (a) and histology (hematoxylin-eosin staining, ×10) of adjacent slices showing localization of ^{67}Ga-P04087 uptake matching with vegetations on aorta root (b) and aorta valve (c), and the absence of uptake in remote myocardium (d).

Discussion

In this study we described the design of a peptide-based radiotracer labelled with Gallium isotopes that might represent a promising alternative to protein-based radiotracers, regarding their low toxicity, improved stability, low immunogenicity, affordable synthesis compared to protein production which is expensive (Burtea et al. 2009) and easy incorporation of a wide variety of functional groups. As drug candidate, peptides have also higher activity per mass than proteins (Burtea et al. 2009).

With this aim, the Fmoc synthesis of PGDLSR, its conjugation with a metal chelator (NODAGA), the evaluation of its affinity to the phosphatidylserine as a biomarker of apoptotic process and platelet activation, its radiolabelling with ^{68}Ga and with ^{67}Ga, the evaluation of its stability in human serum and the evaluation of the in vivo binding to PS were reported.

The use of Fmoc-based synthesis and the conjugation approach described here led to a conjugated peptide with high chemical purity and which can be labelled with gallium isotopes in high radiochemical purity.

The affinity studies of our labelled conjugated peptide showed that the adding of a spacer and of a chelating group in the Peptide N-terminus side did not alter the affinity and binding of R824 to its target. This result is explained if we consider that the

Table 6 Average results of three productions of ^{67}Ga-P04087 conjugated peptide

Parameter	Test method	Average ± SD
Radiochemical purity (%)	Radio-HPLC	98.84 ± 1.22
pH	pH paper	4.5 ± 0

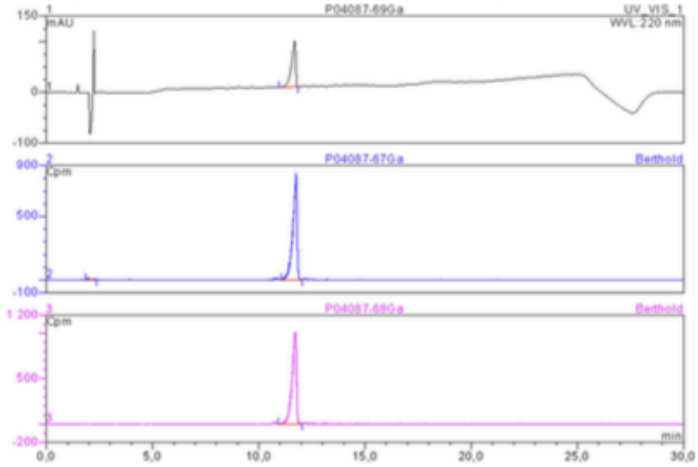


Fig. 7 Typical HPLC chromatogram of (*1*) ^{Nat}Ga-P04087 and radio-chromatograms of (*2*) ^{67}Ga-P04087 and (*3*) ^{68}Ga-P04087. (Analytic conditions: column : ACE® 100 Å C18; 150 mm × 4.6 mm, 3 µm particle size Gradient elution: A) H2O, 0.1% TFA; B) acetonitrile, 0.1% TFA; UV detection at 220 nm; flow: 1 mL/min; 0-2 min isocratic 5% B, 5-35% B linear gradient 20 min, 35-5% B linear gradient 2 min. Retention time (tR) for signal was 11.7 ± 0.07 min

N-terminus amine function of the proline residue is not essential for PS-binding. To the best of our knowledge, proline residue was not described as a part of the peptide sequence which play a dominant role in the interaction with PS. (Igarashi et al. 1995). However, our peptide has a lower affinity compared to Annexin A5, another imaging agent targeting the PS.

Otherwise, the presence of ^{67}Ga-P04087 uptake on autoradiography in contrast to the rapid degradation observed in vitro without the metalloprotease inhibitor, point out the discrepancies that could occur between in vitro and in vivo degradation even when low tracer amounts are used in vitro in order to avoid saturation of enzymes (García-Garayoa et al. 2001). These positive autoradiography results extend the findings of histology experimentations on the binding of the agent to PS. However,

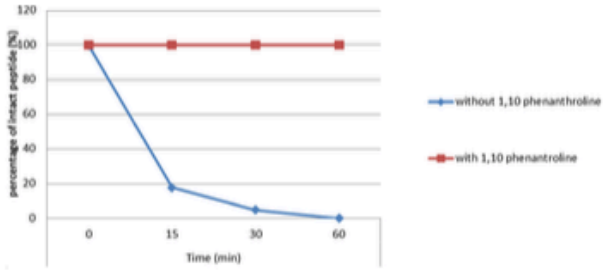


Fig. 8 Degradation kinetics of [Ga]-P04087 in human serum. Gallium radiolabelled P04087 peptide was incubated in human serum at 37 °C in presence and in absence of a metalloprotease inhibitor

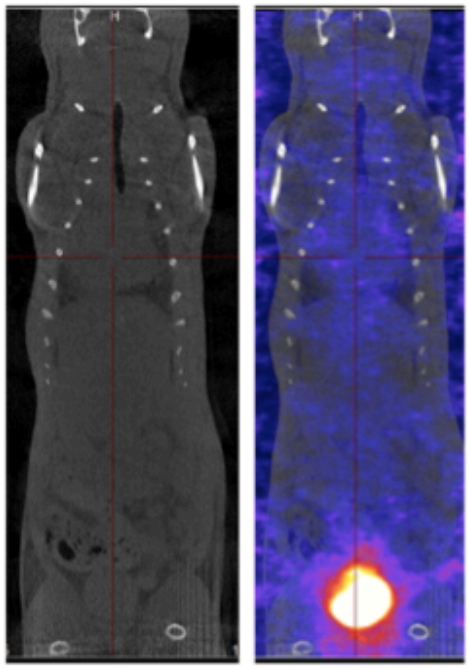


Fig. 9 Infective endocarditis in rat. Whole body SPECT/CT acquired 10 minutes after intravenous injection of 67Ga-P04087 showing intense signal in the bladder due to rapid renal elimination. There is no detectable uptake in the heart area

comparatively to radiolabelled Annexin A5, the contrast was not sufficient to provide a detectable signal. This lack of signal on the SPECT/CT images could have multiple explanations: 1) ^{99m}Tc-AnnexinV has a stronger affinity to PS comparing to Ga-P04087 respectively $6*10^{-9}$ vs $1.852*10^{-7}$M. 2) the low intensity of the signal caused by the physical proprieties of ^{67}Ga is poorly adapted to the gamma camera. 3) The size of vegetations is small (These vegetations have been imaged successfully with other tracers: ^{99m}Tc-AnnexinV with a ratio of 1.3 for in vivo acquisitions and 2 for autoradiography (Rouzet et al. 2008); Annexin A5-128 with similar diagnostic sensitivity than Annexin V (Benali et al. 2014)). 4) ^{67}Ga-P04087 have a rapid renal elimination (visualization of a renal excretion on the acquisition image realized 5 min after injection). 5) ^{67}Ga-P04087 has lower specific activity than ^{99m}Tc-AnnexinV.

Therefore, our work showed that although successful in targeting PS expressed by activated platelets in the rat model of infective endocarditis (autoradiography), the contrast of the signal provided by Ga-P04087 was not sufficient to be detected in vivo.

This lack of signal can reasonably be explained by the lower affinity of ^{67}Ga-P04087 compared with Annexin A5-128 (100 fold ratio). To circumvent this drawback, a structure-activity relationship study might be relevant in order to reach for our peptide, a PS affinity comparable to that of Annexin. Reaching high affinity with small peptides remains a realistic challenge (Hofland et al. 2010). Regarding the improvement of the in vivo metabolic stability, many chemical modifications are described and proved to be

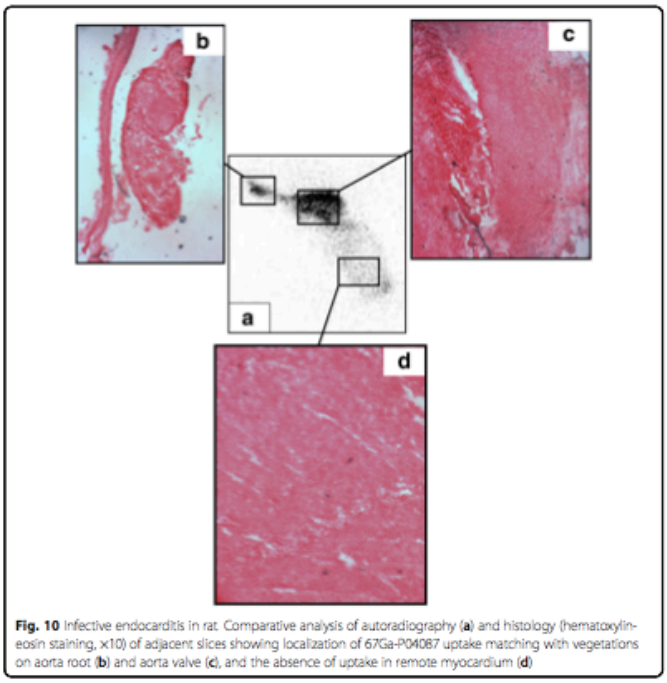


Fig. 10 Infective endocarditis in rat. Comparative analysis of autoradiography (**a**) and histology (hematoxylin-eosin staining, ×10) of adjacent slices showing localization of 67Ga-P04087 uptake matching with vegetations on aorta root (**b**) and aorta valve (**c**), and the absence of uptake in remote myocardium (**d**)

useful. With this aim and as a first step, we might consider that the design of an analogue peptide of ^{67}Ga-P04087 in which L-amino acids would be judiciously replaced by their D-counterparts might retain native peptide affinity but with an improved pharmacological profile (Denèfle et al. 2016).

Although yet unsuccessful, the work realized here is a first step toward the design of a new peptide-based contrast imaging agents targeting PS. Since proteins have several disadvantages over peptides (higher manufacturing costs, higher potential immunogenicity, lower stability, lower activity per mass, worse tissue/organ penetration (Burtea et al. 2009), high liver and kidney uptake (Wuest et al. 2015)), the development of peptide-based radiotracers for imaging apoptosis in vivo remains an interesting and attainable challenge.

Conclusion

A novel labelled peptide Ga-NODAGA-β-alanine-PGDLSR (Ga-P04087) was synthesized and analysed in vitro and in vivo for its PS-binding properties. Despite the preservation in-vitro of the peptide affinity to PS after chemical modifications and gallium labelling and in spite of the presence of ^{67}Ga-P04087 uptake on autoradiography, the absence of detectable foci in vivo makes the peptide used in the present study not suitable as radiotracer for imaging of apoptosis in vivo.

Protein ligands have high affinity to PS but have many drawbacks. Therefore, the development of peptide-based radiotracers for imaging apoptosis in vivo remains a significant challenge. Further studies are necessary to design and evaluate novel radiolabelled peptides with higher binding potencies to PS while possessing enhanced metabolic stability in vivo.

Abbreviations

DCM: Dichloromethane; DIPEA: Diisopropylethylamine; DMF: Dimethylformamide; FSC: Foetal calf serum; HBTU: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOBt: N-hydroxybenzotriazole; MeOH: Methanol; MS: Mass spectrometry; NMP: N-methyl-2-pyrrolidone; PC: Phosphatidylcholine; PE: Phosphatidylethanolamine; PI: Phosphatidylinositol; PM: Plasma membrane; PS: Phosphatidylserine; SM: Sphingomyelin; TFA: Trifluoroacetic acid; TIS: Triisopropylsilane

Acknowledgments

This study was granted by BPI through IMOVA project. The authors are grateful to Jean-François Chappuit, Assistant Professor in British Literature and Civilization at UVSQ for proofreading and correction of the manuscript.

Authors' contributions

RBA carried out and designed radiochemistry, stability studies, helped to the in vivo studies and drafted the manuscript. AG carried out the synthesis of the peptides, the cold chelation with gallium, and the affinity studies and helped to draft the manuscript. KBA carried out the imaging studies, autoradiography and helped to draft the manuscript. FAS designed ^{67}Ga radiochemistry, designed and carried out stability studies and helped to draft the manuscript. WG participated in designing the study. PK, FR and DLG conceived the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Nuclear Medicine Department and DHU FIRE, Bichat-Claude Bernard University Hospital, AP-HP, Paris, France. [2]UMR 1148 Inserm, Paris, France. [3]Fédération de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris 7 University, Paris, France. [4]Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Laboratoire des Biomolécules, Paris, France. [5]Guerbet, Research Center, Aulnay-sous-Bois, France.

Received: 18 September 2016 Accepted: 29 December 2016
Published online: 07 February 2017

References

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J Biol Chem. 1990;265(9):4923–8.

Benali K, Louedec L, Azzouna RB, Merceron O, Nassar P, Al Shoukr F, et al. Preclinical validation of 99mTc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with 99mTc-HYNIC-annexin A5. Mol Imaging. 2014;13:1–10.

Bhat A, Roberts LR, Dwyer JJ. Lead discovery and optimization strategies for peptide macrocycles. Eur J Med Chem. 2015;94:471–9.

Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(11):6349–54.

Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2005;46(12):2035–50.

Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Muraniu O, Rousseaux O, et al. Peptidic targeting of phosphatidylserine for the MRI detection of apoptosis in atherosclerotic plaques. Mol Pharm. 2009;6(6):1903–19.

Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. Chem Biol Drug Des. 2013;81(1):136–47.

Denèfle T, Boullet H, Herbi L, Newton C, Martinez-Torres A-C, Guez A, et al. Thrombospondin-1 mimetic agonist peptides induce selective death in tumor cells: design, synthesis, and structure-activity relationship studies. J Med Chem. 2016;59(18):8412–21.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. Cell Death Differ. 2012;19(1):107–20.

García-Garayoa E, Allemann-Tannahill L, Bläuenstein P, Willmann M, Carrel-Rémy N, Tourwé D, et al. In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin (8–13) analogues with high affinity for NT1 receptors. Nucl Med Biol. 2001;28(1):75–84.

Hofland LJ, Lamberts SWJ, Feelders RA. Role of somatostatin receptors in normal and tumoral pituitary corticotropic cells. Neuroendocrinology. 2010;92 Suppl 1:11–6.

Igarashi K, Kaneda M, Yamaji A, Saido TC, Kikkawa U, Ono Y, et al. A novel phosphatidylserine-binding peptide motif defined by an anti-idiotypic monoclonal antibody. Localization of phosphatidylserine-specific binding sites on protein kinase C and phosphatidylserine decarboxylase. J Biol Chem. 1995;270(49):29075–8.

Jung H-I, Kettunen MI, Davletov B, Brindle KM. Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I. Bioconjug Chem. 2004;15(5):983–7.

Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal Biochem. 1970;34(2):595–8.
Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3–11.
Ma MT, Cullinane C, Imberti C, Baguña Torres J, Terry SYA, Roselt P, et al. New tris (hydroxypyridinone) bifunctional chelators containing isothiocyanate groups provide a versatile platform for rapid One-step labeling and PET imaging with 68Ga3+. Bioconjug Chem. 2016;27(2):309–18.
Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 1995;182(5):1545–56.
van Meer G. Transport and sorting of membrane lipids. Curr Opin Cell Biol. 1993;5(4):661–73.
Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev. 2014;43(1):260–90.
Rouzet F, Dominguez Hernandez M, Hervatin F, Sarda-Mantel L, Lefort A, Duval X, et al. Technetium 99m-labeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of experimental endocarditis. Circulation. 2008;117(6):781–9.
Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel J-B, Le Guludec D. Molecular imaging of platelet activation in thrombus. J Nucl Cardiol Off Publ Am Soc Nucl Cardiol. 2009;16(2):277–86.
Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud J-M, Hervatin F, et al. 99mTc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(9):2153–9.
Scasnár V, van Lier JE. The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. Eur J Nucl Med. 1993;20(3):273.
Tsomaia N. Peptide therapeutics: targeting the undruggable space. Eur J Med Chem. 2015;94:459–70.
Velikyan I. Prospective of ^{68}Ga-radiopharmaceutical development. Theranostics. 2013;4(1):47–80.
Velikyan I, Beyer GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of (68) Ga bioconjugates with high specific radioactivity. Bioconjug Chem. 2004;15(3):554–60.
Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. J Exp Med. 1995;182(5):1597–601.
Wijayanti MA, Sholikhah EN, Tahir I, Hadanu R. Jumina, supargiyono, et al. Antiplasmodial activity and acute toxicity of N-alkyl and N-benzyl-1,10-phenanthroline derivatives in mouse malaria model. J. Health Sci. 2006;52(6):794–9.
Wójcik P, Berlicki Ł. Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. Bioorg Med Chem Lett. 2016;26(3):707–13.
Wuest M, Perreault A, Kapty J, Richter S, Foerster C, Bergman C, et al. Radiopharmacological evaluation of 18F-labeled phosphatidylserine-binding peptides for molecular imaging of apoptosis. Nucl Med Biol. 2015;42(11):864–74.

Submit your manuscript to a SpringerOpen journal and benefit from:

- ► Convenient online submission
- ► Rigorous peer review
- ► Immediate publication on acceptance
- ► Open access: articles freely available online
- ► High visibility within the field
- ► Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

Ainsi, un nouveau peptide marqué Ga-NODAGA-β-alanine-PGDLSR (Ga-P04087) a été synthétisé et analysé *in vitro* et *in vivo* pour ses propriétés de liaison à la PS. Malgré la préservation *in vitro* de l'affinité du peptide pour la PS après modifications chimiques et marquage au gallium et malgré la présence d'une fixation du ^{67}Ga-P04087 mise en évidence sur la végétation d'endocardite sur l'autoradiographie, aucune hyperfixation significative n'a été détectée *in vivo* sur les images scintigraphiques ; et ce comparativement à l'AnxA5 radiomarquée. En effet, le contraste n'était pas suffisant pour un signal détectable. Ce manque de signal sur les images TEMP/TDM pourrait avoir plusieurs explications : 1) la ^{99m}Tc-AnxA5 a une affinité plus forte pour la PS comparativement au Ga-P04087 (respectivement 6x 10-9 vs 1.85 x 10-7M) ; 2) le faible rendement de détection pour le ^{67}Ga de la gamma camera à l'origine d'un signal de faible intensité ; 3) Les végétations sont de petite taille (malgré que pour les mêmes ordres de grandeur d'autres traceurs ont pu les détecter : ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5 avec un rapport de 1,3 pour les acquisitions in vivo et 2 pour l'autoradiographie (Rouzet et al., 2008); AnxA5-128 avec une sensibilité diagnostique similaire à celle de HYNIC-AnxA5 (*121*) ; 4) le ^{67}Ga-P04087 présente une élimination rénale rapide (visualisation d'une excrétion rénale sur l'image réalisée 5 min après l'injection) ; 5) ^{67}Ga-P04087 a une activité spécifique inférieure à celle ^{99m}Tc-AnxA5.

Pour contourner ces inconvénients, une suite de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo* est nécessaire visant à améliorer les paramètres d'acquisition et de reconstruction, à tenter de ralentir la dégradation du peptide par des inhibiteurs enzymatiques et à essayer le profil pharmacologique du peptide (*122*). Malheureusement, le laboratoire Guerbet a cessé la production de ce peptide.

Bien qu'encore infructueux, le travail réalisé ici est un premier pas vers la conception de nouveaux agents d'imagerie à base de peptides ciblant la PS avec une haute affinité. Ceci reste un défi intéressant et réalisable (*101*).

2.2 VALIDATION PRE-CLINIQUE DE L'^{99m}Tc-AnxA5-128

2.2.1 Comparaison avec l'^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5

Plusieurs essais cliniques conçus pour évaluer l'AnxA5-128 dans divers contextes sont sur le point de commencer. Dans notre équipe, nous avons jugé nécessaire la validation préclinique de cette forme GMP de de l'AnxA5-128 dans le domaine cardiovasculaire.

Nous avons donc comparé les biodistributions, les pharmacocinétiques des deux traceurs la ^{99m}Tc-AnxA5-128 et la ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5. Ensuite nous avons comparé leurs capacités diagnostiques dans deux modèles expérimentaux chez le rat : un modèle de myocardite auto-immune (imagerie de l'apoptose) et un modèle d'endocardite infectieuse (imagerie de l'activation plaquettaire).

L'ensemble de ces travaux sont détaillés dans l'article paru dans la revue *Molecular Imaging* (*121*).

Les principales conclusions de ce travail sont que la clairance sanguine initiale était plus rapide pour la ^{99m}Tc-AnxA5-128. Les biodistributions tissulaires étaient globalement comparables. Enfin, la sensibilité diagnostique de l'AnxA5-128 était excellente et comparable à celle de la HYNIC-AnxA5. Ces résultats prometteurs confortent l'utilisation de l'AnxA5-128 en clinique.

RESEARCH ARTICLE

Preclinical Validation of ^{99m}Tc–Annexin A5-128 in Experimental Autoimmune Myocarditis and Infective Endocarditis: Comparison with ^{99m}Tc–HYNIC–Annexin A5

Khadija Benali, Liliane Louedec, Rana Ben Azzouna, Olivier Merceron, Pierre Nassar, Faisal Al Shoukr, Anne Petiet, Donato Barbato, Jean-Baptiste Michel, Laure Sarda-Mantel, Dominique Le Guludec, and Francois Rouzet

Abstract

Hydrazinonicotinamide–annexin A5 (HYNIC-Anx), a 99m technetium (^{99m}Tc)-labeled agent targeting phosphatidylserine, proved to be sensitive for the detection of apoptosis and thrombosis but is no longer available for clinical use. A mutant of human annexin designed for direct ^{99m}Tc labeling (referred to as Anx A5-128) showed improved binding affinity to phosphatidylserine and is expected to be used in humans. We compared both radiotracers with regard to pharmacokinetics and diagnostic ability in animal models. Biodistribution studies were performed in normal rats. Radiolabeled Anx A5-128 and HYNIC-Anx were compared in cardiovascular settings involving phosphatidylserine expression: experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis. Initial blood clearance was faster for Anx A5-128 than for HYNIC-Anx, and tissue biodistribution was similar overall for both tracers. The diagnostic sensitivity of Anx A5-128 was excellent and comparable to that of HYNIC-Anx. Anx A5-128 showed biodistribution and diagnostic ability similar to those of the HYNIC-Anx derivative, supporting its translation to clinical use.

ANNEXIN A5 is an endogenous protein (36 kDa) that specifically binds with nanomolar affinity to phosphatidylserine (PS) exposed by apoptotic cells and activated platelets.[1,2] Radiolabeled annexin A5 (Anx) has been successfully evaluated as a molecular imaging agent of apoptotic cells and thrombus, with many potential clinical applications in oncology, cardiovascular diseases, and rheumatology.[1] The most widely used compound designed to 99m technetium (^{99m}Tc) labeling has been achieved by conjugation of the hydrazinonicotinamide (HYNIC) chelating group with recombinant human Anx A5 (rh-Anx)[1] in preclinical studies (for a review, see Boersma and colleagues[1] and Rouzet and colleagues[2]), healthy volunteers,[3] and various oncologic settings in humans.[4–8] However, Tait and colleagues showed that random amine-directed modification of Anx, such as HYNIC derivatization, was associated with multiple molecular species and finally reduced its overall membrane-binding affinity.[9] Additionally, preformulated radiolabeling kits (formerly supplied by Theseus Imaging Corp., Worcester, MA) are no longer available for clinical use.[1]

Mutants of rh-Anx were developed for direct site-specific ^{99m}Tc labeling by the addition of a unique ^{99m}Tc-chelating oligopeptide sequence at their N-terminus.[10] The N-terminal region of Anx is located on the concave face of the molecule, opposite the binding site,[11] resulting in unaltered membrane-binding affinity compared to wild-type rh-Anx.[9] One of those derivatives, referred to as Anx A5-128, showed increased in vivo binding on apoptotic cells compared to HYNIC-Anx.[9] Moreover, ^{99m}Tc labeling of this new Anx derivative is quite straightforward, with good radiochemical purity, and Good Manufacturing Practices (GMP) grade Anx A5-128 kits designed for ^{99m}Tc labeling are undergoing the agreement process for human use in the United States and Europe (Atreus Pharmaceuticals, Ottawa, ON). Additionally, several clinical trials designed to assess Anx A5-128 in various settings are about to begin, and precise preclinical validation is mandatory.

Since preclinical validation has been obtained with HYNIC-Anx, but clinical studies will be carried out with

From Inserm, U1148, and Paris Diderot University, Paris, France; Department of Nuclear Medicine, Bichat-Claude Bernard Hospital, AP-HP, Paris, France; Fédération de Recherche en Imagerie Multimodale, Paris Diderot University, Paris, France; and Advanced Accelerator Applications - via Ribes 5 - 10010 - Colleretto Giacosa, Turin, Italy.

Address reprint requests to: François Rouzet, MD, PhD, Inserm, U1148, 46 rue Henri-Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France; e-mail: francois.rouzet@bch.aphp.fr.

DOI 10.2310/7290.2014.00049

© *2014 Decker Intellectual Properties*

DECKER

the new Anx A5-128 variant, it is necessary to ascertain whether both forms of radiolabeled Anx are comparable with regard to biokinetics and diagnostic ability in animal models. Diagnostic value has been evaluated in cardiovascular settings in which radiolabeled Anx is likely to meet clinical demand, representative of the two biological pathways involving PS exposure: (1) experimental autoimmune myocarditis because it is associated with cardiomyocyte and lymphocyte apoptosis,[12–15] which is likely to be associated with therapy efficacy,[16] and (2) infective endocarditis because the relationship between focal Anx uptake and platelet activation in vegetations has been previously evidenced.[17,18]

Methods

Experimental Models

The procedures and animal care complied with the principles of animal care formulated by the National Society for Medical Research. This study was conducted under the authorization of the French Directorate of Veterinary Services (No. 75-214) and the approval of the animal ethics committee of our institution.

Experimental Autoimmune Myocarditis

Experimental autoimmune myocarditis was induced in 12 male Lewis rats by immunization with purified rat cardiomyosin.[19] Animals were housed and treated in accordance with institutional guidelines for animals.

Myosin purification Cardiac rat myosin was purified according to the Shiverick technique.[20] Cardiac myosin purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis. The protein concentration was measured using the Bradford technique, and myosin was then emulsified with phosphate-buffered saline (PBS) to obtain a final solution of 4 mg/mL and was stored in aliquots at −20°C.

Rat immunization To induce autoimmune myocarditis, purified myosin was first emulsified with an equal volume of complete Freund adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco) to a final concentration of 2 mg/mL (solution A). Myosin was replaced by an equivalent volume of PBS added to the complete Freund adjuvant/*M. tuberculosis* solution for control rats (solution B). Six hundred micrograms of rat cardiomyosin in solution A was injected subcutaneously in Lewis rats at day 0 and day 7 (experimental autoimmune myocarditis group), whereas an equivalent volume of solution B was used for the control group ($n = 16$).

Infective Endocarditis in Rats

Infective endocarditis was induced in 12 male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) as described previously.[17] In brief, a polyethylene catheter was inserted into the left ventricle through the right carotid artery in anesthetized rats (ketamine/xylazine). The catheter remained indwelling throughout the experiment to induce an aseptic thrombotic vegetation formation on the aortic valves. Twenty-four hours after catheterization, rats underwent bacterial inoculation (10^8 colony-forming units of *Enterococcus faecalis* JH2-2) by the left jugular vein under halothane anesthesia.

Annexin Labeling Procedure

HYNIC-Anx

Freshly eluted sodium pertechnetate (1,110–1,850 MBq) and 50 μg stannous tricine buffer (pH 6) were added to a vial containing 275 μg recombinant human HYNIC-Anx A5 (National Cancer Institute BRB Preclinical Repository, Frederick, MD) and left to incubate for 15 minutes at room temperature. The quality control was performed with instant thin-layer chromatography developed in acid citrate dextrose buffer. The radiochemical purity was 89.5 ± 1.3% ($n = 20$).

Anx A5-128

Anx A5-128 was provided (Atreus Pharmaceuticals and Advanced Accelerator Applications, Saint-Genis Pouilly, France) as lyophilized radiolabeling kits manufactured according to GMP quality requirements, taken from a batch intended for first-in-human administration. The material was shipped within 6 months after manufacturing. A single-dose vial contains 400 μg of Anx A5-128, 10 μg of stannous chloride as a reducing agent, and other excipients. For radiolabeling, freshly eluted sodium pertechnetate (1,110–1,850 MBq in 0.6–1 mL) was added to the vial and left to incubate for 1.5 hours at room temperature according to the manufacturer's instructions. The quality control was performed with instant thin-layer chromatography developed in acid citrate dextrose buffer. The radiochemical purity was 96.9 ± 0.9% ($n = 20$). To check for potential high-molecular-weight impurities, the solution was filtered through a 0.22 μm filter (Millex-GV filter, 0.22 μm, 4 mm)

in a series of eight radiolabeling procedures of Anx A5-128. The radioactivity loss was 3.7 ± 1.6%, corresponding to the dead volume of the filter (< 10 µL according to the manufacturer's specifications).

Both precursors were stored at −40°C and used within 6 months of receipt.

Biodistribution Studies

Blood Clearance Assessment

Twelve male Wistar rats were anesthetized with urethane (1.22 g/kg). A catheter was inserted into the left carotid for blood sampling. Each animal received a single intravenous injection (penis vein) of 43.6 ± 9.2 MBq (corresponding to 15.7 ± 3.3 µg of protein) ^{99m}Tc-Anx-128 (n = 6) or 47.3 ± 4.2 MBq (corresponding to 11.7 ± 1.0 µg of protein) ^{99m}Tc-HYNIC-Anx (n = 6) in a 250 µL volume. Blood samples (250 µL) were taken 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes postinjection. For each sample, one aliquot of 100 µL was taken for well counting (Cobra II, Packard, Meriden, CT).

Tissue Biodistribution of ^{99m}Tc–Anx-128 and ^{99m}Tc–HYNIC-Anx

Two groups of male Wistar rats (weight 320–335 g) were injected with an activity of 49.9 ± 8.5 MBq (corresponding to 18.0 ± 3.1 µg of protein) ^{99m}Tc–Anx-128 (n = 6) or 54.2 ± 6.6 MBq (corresponding to 13.4 ± 1.6 µg of protein) ^{99m}Tc–HYNIC-Anx (n = 6). Animals were euthanized with pentobarbital overdose 60 minutes after intravenous injection of tracer, and relevant organs and tissues were harvested, washed, and weighed. Each tissue and the injected solution were aliquoted for well counting. After correction for residual activity in the injection site and radioactive decay, the results were expressed as the percentage of administered dose per gram of organ (%ID/g) and by the percentage of administered dose per organ (%ID/organ). Blood, muscles, bone, and skin (and hairs) were assumed to represent, respectively, 6%, 40%, 10%, and 18% of the body weight.[17]

Imaging Procedures

Myocarditis Model

Imaging was performed 3 weeks after immunization. The natural history of acute autoimmune myocarditis over weeks allows considering the absence of significant disease progression in a time span of a few days. Consequently, each myocarditis rat has been injected (60 MBq) and imaged sequentially with both tracers (^{99m}Tc–HYNIC-Anx first in six animals) 2 days apart, assuming that myocardial injury would have remained stable during this period. Additionally, a group of controls was injected with either ^{99m}Tc–HYNIC-Anx or ^{99m}Tc–Anx A5-128 (n = 8 for each tracer).

Endocarditis Model

Imaging was performed 4 days after bacterial inoculation. Due to the rapid progression of the disease, sequential imaging of the same animal was not feasible. Therefore, endocarditis models were injected (60 MBq) with either one of the tracers (n = 6 for each tracer).

Acquisition and Reconstruction Parameters

Helical single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) was performed under intraperitoneal pentobarbital (4 mg/100 g body weight) anesthesia with a four-headed multiplexing multipinhole camera (NanoSPECT/CT plus, Bioscan Inc., Washington, DC). Each head was equipped with a tungsten collimator (rat whole body – high resolution). Flat-panel detector CT was performed first (tube voltage 55 kV, tube current 145 mAs), and then the helical SPECT acquisition was performed with the following parameters: helical scan with 28 projections/rotation plus circular scan at the beginning and at the end of the scan range, matrix size 256 × 256, zoom 1.14 (pixel size 1 mm^2). SPECT data were reconstructed using *HiSPECT* (Bioscan Inc.) iterative reconstruction software on a dedicated workstation and visualized using *InVivoScope* software with coregistration of SPECT and CT images.

Data Analysis

Myocarditis model Scintigrams were assessed visually to determine the presence of a focal or diffuse tracer uptake in the myocardium. For in vivo quantification, activity (kBq per voxel) was measured in regions of interest drawn over focal uptake when present or encompassing the left ventricular myocardium (midportion) in the absence of focal uptake and the lung to serve as background activity.

Endocarditis model Scintigrams were assessed visually to determine the presence of a focal tracer uptake in the heart and measured as previously indicated. The ratio between myocardium to lung activity (uptake ratio) was calculated.

Autoradiography

After completion of SPECT/CT, animals were euthanized with pentobarbital overdose. Tissue samples were frozen and cut into transverse sections of 20 μm thickness, which were exposed in a digital beta imager (BetaIMAGER, Biospace Lab, Paris, France) for 8 hours.

Myocarditis Model

Quantification was performed by calculating the ratio between the activity (mean counts/mm^2) of the left ventricular section in the myocarditis models and in controls.

Endocarditis Model

Quantification was performed by calculating the ratio between the activity (mean counts/mm^2) of the vegetation and the activity of a region of interest drawn on normal myocardium remote from the vegetation.

Histology and Immunohistochemistry

At sacrifice, transverse sections were frozen for one part (autoradiography) and fixed in buffered paraformaldehyde (4% v/v, 48 hours) for the other to obtain better morphologic definition. Fixed tissues were embedded in paraffin and sectioned at 5 μm thickness. Sections were stained with hematoxylin-eosin for morphologic analysis of cells and nuclei. In myocarditis, sections from both immunized and control rats were used for apoptotic assessment using the Apostain assay (Alexis Corp., Lausen, Switzerland).

Statistical Analysis

Continuous data were expressed as mean and standard deviation and compared by use of unpaired Student *t*-test in myocarditis (12 myocarditis and 8 controls) and as median and range and compared by use of the nonparametric Mann-Whitney *U* test in endocarditis ($n = 6$) (*MedCalc* version 12.5, MedCalc Software, Ostend, Belgium). The level of significance was set at $p < .05$.

Results

Blood Clearance and Tissue Biodistribution

After intravenous injection, blood clearance of both tracers followed a two-compartment model (Figure 1). Initial blood clearance (α component) was more rapid for ^{99m}Tc–Anx A5-128 with an effective half-life of 10.5 minutes (accounting for 87% of the injected activity) versus 18 minutes (accounting for 90% of the injected activity) for ^{99m}Tc–HYNIC-Anx. The slow component was 217 minutes (accounting for 13% of the injected activity) for ^{99m}Tc–Anx-128 and 153 minutes (accounting for 10% of the injected activity) for ^{99m}Tc–HYNIC-Anx. The blood activity of ^{99m}Tc–Anx-128 was consistently lower than that of ^{99m}Tc–HYNIC-Anx at each time point ($p < .05$) but remained below 5% of the injected dose from 30 minutes after injection for both tracers.

For both tracers, the highest concentrations were found in kidneys (and urine) and then liver, spleen, and muscles (Table 1). Bone marrow presented a mild tracer uptake, which was also detectable on SPECT. It should be noted that the physiologic uptake was very low on myocardium and brain. Tissue biodistribution assessed 60 minutes after injection showed a lower uptake of ^{99m}Tc–Anx A5-128 compared to HYNIC-Anx in liver and thyroid, whereas the uptake was greater with ^{99m}Tc–Anx A5-128 in heart and lungs.

Myocarditis

Visual analysis of SPECT/CT was positive with both tracers in all animals with myocarditis and negative in controls (Figure 2 and Figure 3). The general pattern was a moderate and heterogeneous myocardial tracer uptake in myocarditis rats, with additional intense focal uptake in 8 of 12 rats. In case of additional focal uptake, their location and intensity were similar with both tracers (see Figure 3, A and B). Quantitative analysis of myocardial focal uptake/lung ratio in myocarditis and control groups was 1.7 ± 0.6 versus 1.0 ± 0.3, respectively ($p = .006$), with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx and 1.7 ± 0.5 versus 1.2 ± 0.2, respectively ($p = .003$), with ^{99m}Tc–Anx A5-128. Uptake ratios were not significantly different between tracers in the myocarditis and control groups (Figure 4).

Autoradiography showed diffuse Anx myocardial uptake with more intense and focal hot spots in the myocardium of rats with myocarditis, whereas the uptake was faint and uniform in controls. Histologic analysis showed injured myocytes that disappeared and mononuclear cell infiltrates diffusely distributed throughout the myocardium, with clusters frequently located in the subepicardium. Comparative analysis of autoradiography and histology performed on the same slices showed colocalization of Anx uptake (whatever the form) and myocardial damage (see Figure 3, C and D), characterized by myocyte disappearance and immune cell infiltrates (see

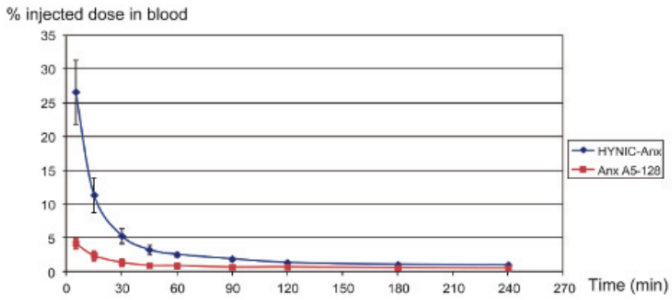


Figure 1. Blood clearance of ^{99m}Tc-Anx A5-128 and ^{99m}Tc–HYNIC-Anx ($n = 6$ in each group). After correction for residual activity in the injection site and decay, the results are expressed as a percentage of the administered dose remaining in the blood pool according to time, assuming that blood represents 6% of body weight. Initial blood clearance was faster with ^{99m}Tc–Anx A5-128 than with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx (half-life of rapid component: 10.5 minutes vs 18 minutes, respectively). Blood activity of ^{99m}Tc–Anx A5-128 was consistently lower than that of ^{99m}Tc–HYNIC-Anx at each time point ($p < .05$).

Figure 3, E–G). Both injured cardiomyocytes and immune cell infiltrates were positive for Apostain.

Infective Endocarditis

Macroscopic examination at sacrifice showed that left-sided vegetations were localized mainly on the aortic valves but could also be observed on the aortic wall along the catheter path and in the left ventricle (apex), as previously described.[17] Visual analysis of SPECT/CT was positive with both tracers in all endocarditis rats. This focal uptake was intense in the aortic valve area and could be associated with foci localized in the ascending aorta or left ventricular apex (Figure 5, A and B). Quantitative analysis of vegetation uptake on SPECT was (median and range) 2.5 (1.4–9.6) with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx versus 4.7 (2.1–8.7) with ^{99m}Tc–Anx A5-128 ($p = .3$) (Figure 6A). Vegetation to remote myocardium ratio on autoradiography was (median and range) 8.1 (2.8–31) with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx and 11 (2.2–24) with ^{99m}Tc–Anx A5-128 ($p = .4$) (Figure 6B).

Comparative analysis of autoradiography and histologic slices demonstrated localization of Anx uptake (whatever the tracer) at the peripheral layer of vegetations, corresponding to the site of vegetation growth through platelet recruitment from the blood pool (Figure 5, C–E), without significant positive cell for apoptosis, as previously described.[17,18]

Discussion

This study shows that Anx A5-128 is comparable to HYNIC-Anx as a molecular imaging agent of exposed PS with regard to biodistribution and diagnostic ability in rat models of cardiovascular diseases. Blood clearance of Anx A5-128 is more rapid than that of HYNIC-Anx, but without a significant impact on contrast of images. The diagnostic sensitivity was excellent for both tracers, with an abnormal uptake detectable in all animals with autoimmune myocarditis or infective endocarditis. The first model is characterized by an acute autoimmune injury of the myocytes containing myosin associated with immune cell infiltrate within the myocardium (see Watanabe and colleagues[21] for a review). In our experiments, both injured myocytes and immune cells could be positive for Apostain, providing evidence that both cell types could expose PS on their membrane and bind Anx, due to antibody-mediated myocyte injury leading to myocyte death for one part and immune cell maturation involving both immune cell proliferation and selection through apoptosis of nonrelevant cells for another part. In humans, evidence of cardiomyocytes' membrane leakage in acute myocarditis was obtained in vivo by use of indium 111–labeled antimyosin antibodies.[22] In such patients, antimyosin antibody uptake pattern was either diffuse or focal and not systematized, comparable to that obtained with Anx in the present study.

The model of infective endocarditis is characterized by the development of active vegetations, involving platelet aggregates, which highly expose PS as a link between platelet activation and fibrin formation,[17,18] generating intense uptake of Anx A5 in the absence of significant apoptosis.[2]

Blood Clearance

The most striking difference between Anx A5-128 and HYNIC-Anx was blood clearance, mainly the rapid component during the first hour after injection. Less than 2% of the injected activity of Anx A5-128 remained in the blood pool 30 minutes after intravenous injection, which confers an advantage for the tracer in early imaging,

Table 1. Tissue Biodistribution of ^{99m}Tc-Anx A5-128 and ^{99m}Tc-HYNIC-Anx, 1 Hour after Intravenous Injection

	% Injected Activity/g of Organ (%IA/g)		*% Injected Activity/Organ (%IA/organ)*	
	^{99m}Tc-Anx 128	*^{99m}Tc–HYNIC-Anx*	*^{99m}Tc-Anx 128*	*^{99m}Tc–HYNIC- Anx*
Liver*	0.25 ± 0.053	1.65 ± 1.50	2.80 ± 0.77	14.78 ± 8.70
Spleen	0.45 ± 0.11	0.227 ± 0.075	0.39 ± 0.12	0.195 ± 0.064
Heart*	0.021 ± 0.006	0.009 ± 0.004	0.022 ± 0.006	0.010 ± 0.004
Lungs*	0.08 ± 0.01	0.032 ± 0.012	0.10 ± 0.02	0.050 ± 0.016
Brain	0.001 ± 0.0005	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.002
Muscle	0.014 ± 0.012	0.007 ± 0.003	1.43 ± 1.23	0.96 ± 0.43
Bones	0.032 ± 0.0093	0.009 ± 0.003	0.79 ± 0.14	0.28 ± 0.084
Skin	0.022 ± 0.019	0.010 ± 0.002	1.05 ± 0.91	0.57 ± 0.13
Thyroid**	0.046 ± 0.030	0.13 ± 0.04	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.001
Testis	0.007 ± 0.003	0.005 ± 0.002	0.018 ± 0.09	0.015 ± 0.004
Stomach	0.037 ± 0.043	0.046 ± 0.029	0.07 ± 0.09	0.093 ± 0.069
Kidneys	3.98 ± 0.24	3.08 ± 0.75	9.2 ± 1.1	8.9 ± 1.6
Blood***	0.05 ± 0.04	0.19 ± 0.08	0.72 ± 0.55	3.36 ± 1.60
Urine	0.88 ± 1.4	1.12 ± 1.12	ND	ND

ND = not determined.
*$p < .02$; **$p = .04$; ***$p = .03$.

particularly in cardiac and vascular applications. In our previous work aiming to assess the diagnostic ability of HYNIC-Anx in endocarditis, we found that the contrast was optimal between 1 and 2 hours after injection.[17] In previous studies evaluating Anx A5-128 uptake in animal models of apoptosis, data acquisition (in vitro and in vivo) was also performed 60 minutes after injection.[9,23] However, this may not apply to tissues such as tumors, where penetration of imaging agents is necessary.

Extensive biodistribution of HYNIC-Anx in rats has been reported by Ohtsuki and colleagues, with a blood clearance pattern similar to ours.[24] Conversely, we found some differences in tissue biodistribution such as kidney and spleen uptake, whereas liver, lung, and blood-pool activity were comparable. To date, there are no published data of tissue biodistribution of Anx A5-128 in rats, but we found a quite similar uptake to that reported by Tait and colleagues in mice for kidney and spleen.[23] However, they

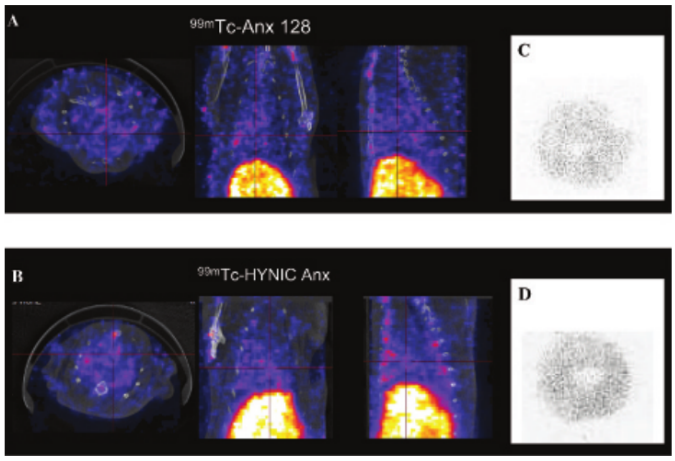


Figure 2. Representative images in control rats. No abnormal uptake was detectable on SPECT/CT in the heart area either with ^{99m}Tc–Anx A5-128 (A) or with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx (B). On autoradiography of a myocardial slice, the tracer uptake was faint and homogeneous with both tracers (C, D).

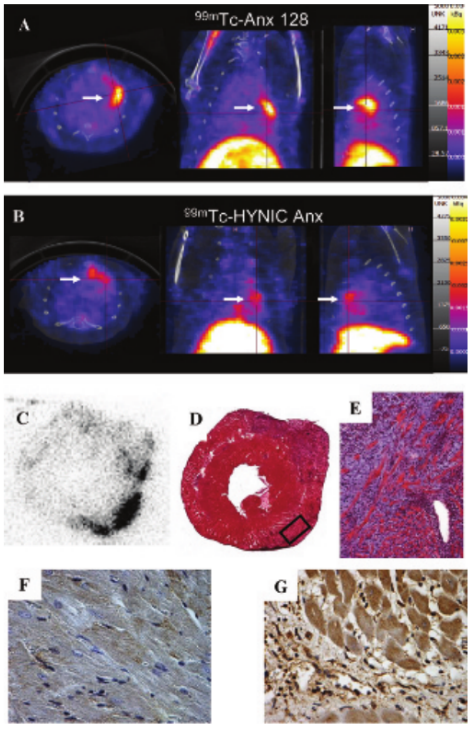


Figure 3. Experimental autoimmune myocarditis in rat (SPECT/CT) 3 weeks after immunization. Images are normalized for maximal activity (kBq)/pixel because the greatest value is outside the cardiac area. Acquisitions were performed 1 hour after intravenous injection of ^{99m}Tc–Anx A5-128 (A) or ^{99m}Tc–HYNIC-Anx (B) 2 days apart in the same animal (the natural history of acute autoimmune myocarditis over weeks allows considering the absence of significant disease progression in a time span of a few days). Comparable focal uptake is detectable on the anterior wall with both tracers (*arrow*). Comparative analysis of autoradiography (C) and histology (D, hematoxylin-eosin stain, ×10 original magnification; E, inlet ×40 original magnification) on the same slice showing colocalization of annexin uptake (^{99m}Tc–HYNIC-Anx) and areas of myocyte damage, edema, and cell infiltration. The background of Apostain staining was low in the control heart (negative controls, F; ×40 original magnification), whereas it was intense in tissue areas characterized by myocyte disappearance and immune cell infiltrates (G; ×40 original magnification). Both injured cardiomyocytes and immune cell infiltrates were positive for Apostain.

reported eightfold greater renal uptake for HYNIC-Anx compared to Anx A5-128. We did not find such a difference, and in our study, renal uptake was comparable for both forms, in the range of values reported by Ohtsuki

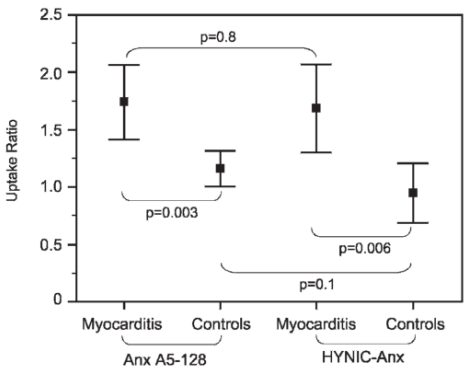


Figure 4. Comparison of uptake ratios in rat models of experimental autoimmune myocarditis (n = 12) injected sequentially with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx and ^{99m}Tc–Anx A5-128 (2 days apart, ^{99m}Tc–HYNIC-Anx first in six animals) and in controls (n = 8 for each tracer). Data are presented as mean and 95% confidence interval.

and colleagues,[24] thus suggesting a species-related difference. The slightly greater thyroid uptake with ^{99m}Tc–HYNIC-Anx compared to ^{99m}Tc–Anx A5-128 is likely to be related to lower radiochemical purity.

Diagnostic Ability

The site-specific labeling of the new variant Anx A5-128 at the N-terminus of the protein, distant from the binding site, was associated with an increase in PS binding affinity and greater uptake in vivo on the apoptotic cells of mice liver after treatment with cyclophosphamide, compared to HYNIC derivatization.[9] The faster blood clearance of Anx A5-128 (see Tait and colleagues[23] and the present study) is likely to result in the lowest background activity and potentially better image contrast compared to HYNIC-Anx. The present study shows uptake ratios greater with Anx A5-128 than with HYNIC-Anx consistently in apoptosis and thrombus, but without a significant difference. Although larger samples may have allowed us to reach significance, the difference remains small between both tracers, for three main reasons: (1) even if the binding affinity of HYNIC-Anx is slightly lower than that of Anx A5-128, it is still in the nanomolar range, allowing stable binding of the imaging agent to the target; (2) the remaining activity of HYNIC-Anx in the blood pool 1 hour after injection is only around 3% of the injected activity, with a very limited impact on image contrast; and (3) on

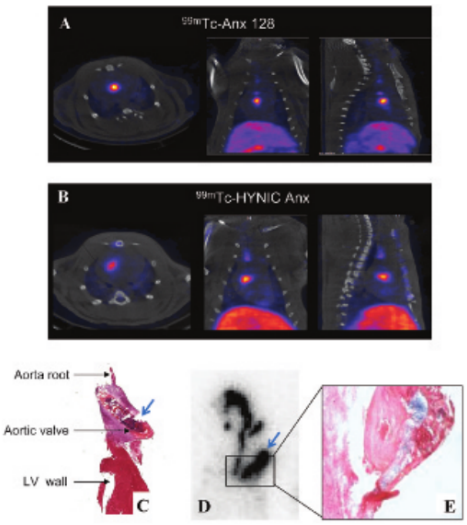


Figure 5. Infective endocarditis in rat (SPECT/CT). Both acquisitions were performed 1 hour after intravenous injection of ^{99m}Tc–Anx A5-128 (A) or ^{99m}Tc–HYNIC-Anx (B), in different animals. A focal uptake is detectable in the aortic valve area with both tracers (*arrow*). Comparative analysis of autoradiography (C) and histology (D, hematoxylin-eosin stain, ×10 original magnification; E, Alcian blue stain, ×40 original magnification) on adjacent slices showing localization of annexin uptake (^{99m}Tc–Anx A5-128) matching with vegetations (*arrow*) on the aortic valve and aorta root. LV = left ventricular.

normal myocardium, nonspecific binding measured as tissue activity in control animals was slightly greater with Anx A5-128 compared to HYNIC-Anx. Taken together, these results show that the new Anx variant provides images of quality at least equivalent to HYNIC form, with excellent diagnostic value.

Clinical Applications

Our group[14] and others[12] reported on the increased HYNIC-Anx uptake in acute and subacute animal models of myocarditis and on the correlation of HYNIC-Anx cardiac uptake and number of apoptotic cells in this setting. There is a clinical demand for better diagnosis and characterization of inflammatory cardiac diseases that is not met by current diagnostic tools.[25] Cardiac magnetic resonance does not allow for precise identification of immune injury or early therapy monitoring,[26] and fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG–PET) is hampered by physiologic cardiac uptake of the tracer. As well, although diagnosis of endocarditis relies on clinical data, biology, and echocardiography, recent studies using whole body scanning with FDG-PET showed that half of septic embolisms were not detected by morphologic imaging alone.[27,28] Even if FDG-PET is now readily available in routine practice, its diagnostic value is likely to be hampered by the physiologic uptake of the tracer by heart and brain. In this regard, by targeting specifically PS exposed on the membrane surface, radiolabeled Anx offers the advantage of being devoid of significant cardiac and cerebral uptake, thus allowing us to perform a comprehensive evaluation of the disease in a single scan. Clinical translation of Anx imaging is therefore strongly desirable, and the present study supports its assessment in diseases such as myocarditis or endocarditis. However, these settings are relatively rare, and further validation in conditions affecting larger populations is required. Hence, a large body of preclinical data supports the potential clinical usefulness of radiolabeled Anx to target apoptosis in monitoring the response to therapy in cancer[1] and rheumatoid and other autoimmune diseases.[29,30] In the setting of atherothrombosis, Anx uptake may be regarded as a marker of plaque vulnerability by targeting both apoptotic cells (such as macrophages and smooth muscle

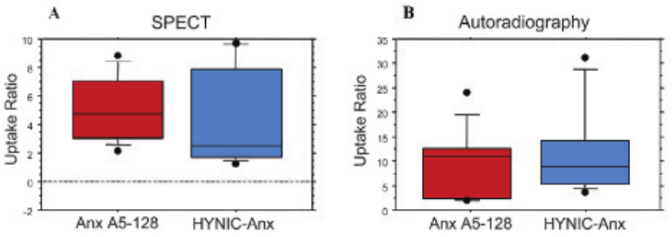


Figure 6. Comparison of uptake ratios between ^{99m}Tc–Anx A5-128 and ^{99m}Tc–HYNIC-Anx in infective endocarditis models (n = 6 in each group). The results are presented as box plots for SPECT (A) and autoradiography (B) and show no significant difference between tracers.

cells) and activated platelets as key components of intraluminal thrombus.[31]

Conclusions

The present study showed that Anx A5-128 was comparable to HYNIC-Anx with regard to biodistribution and diagnostic ability in a model of apoptosis (myocarditis) and in a model of platelet activation (endocarditis) in rats. Blood clearance of Anx A5-128 is more rapid than that of HYNIC-Anx, but without a significant impact on contrast of images. This study suggests that the new variant Anx A5-128 may represent an attractive alternative to HYNIC-Anx and supports the clinical translation of radiolabeled Anx A5-128 imaging.

Acknowledgments

We would like to thank Atreus Pharmaceuticals and Advanced Accelerator Applications for supplying the Anx A5-128 labeling kits and the National Cancer Institute BRB Preclinical Repository for supplying the HYNIC-Anx labeling kits.

Financial disclosure of authors: Donato Barbato is an employee of Advanced Accelerator Applications.

Financial disclosure of reviewers: None reported.

References

1. Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med 2005;46:2035–50.
2. Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel JB, Le Guludec D. Molecular imaging of platelet activation in thrombus. J Nucl Cardiol 2009;16:277–86, doi:10.1007/s12350-009-9053-5.
3. Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, et al. Safety, biodistribution, and dosimetry of 99mTc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. J Nucl Med 2003;44:947–52.
4. van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, et al. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC annexin V single photon emission computed tomography. J Clin Oncol 2003;21:3483–7, doi:10.1200/JCO.2003.12.096.
5. Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, et al. In vivo imaging of apoptosis by 99mTc-Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response. Radiother Oncol 2004;72:333–9, doi:10.1016/j.radonc.2004.07.008.
6. Rottey S, Slegers G, Van Belle S, et al. Sequential 99mTc-hydrazinonicotinamide-annexin V imaging for predicting response to chemotherapy. J Nucl Med 2006;47:1813–8.
7. Loose D, Vermeersch H, De Vos F, et al. Prognostic value of 99mTc-HYNIC annexin-V imaging in squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:47–52, doi:10.1007/s00259-007-0577-0.
8. Hoebers FJ, Kartachova M, de Bois J, et al. 99mTc HYNIC-rh-Annexin V scintigraphy for in vivo imaging of apoptosis in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:509–18, doi:10.1007/s00259-007-0624-x.
9. Tait JF, Smith C, Levashova Z, et al. Improved detection of cell death in vivo with annexin V radiolabeled by site-specific methods. J Nucl Med 2006;47:1546–53.
10. Tait JF, Brown DS, Gibson DF, et al. Development and characterization of annexin V mutants with endogenous chelation sites for (99m)Tc. Bioconjug Chem 2000;11:918–25, doi:10.1021/bc000059v.
11. Huber R, Berendes R, Burger A, et al. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. J Mol Biol 1992;223:683–704, doi:10.1016/0022-2836(92)90984-R.
12. Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, et al. 99mTc-HYNIC-annexin V imaging to evaluate inflammation and apoptosis in rats with autoimmune myocarditis. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003;30:232–8, doi:10.1007/s00259-002-1006-z.
13. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. Cardiovasc Pathol 2003;12:255–62, doi:10.1016/S1054-8807(03)00077-2.
14. Peker C, Sarda-Mantel L, Loiseau P, et al. Imaging apoptosis with (99m)Tc-annexin-V in experimental subacute myocarditis. J Nucl Med 2004;45:1081–6.
15. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, et al. Modulation of endoplasmic reticulum stress and cardiomyocyte apoptosis by mulberry leaf diet in experimental autoimmune myocarditis rats. J Clin Biochem Nutr 2012;50:139–44, doi:10.3164/jcbn.11-44.
16. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, et al. Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy. J Cell Mol Med 2012;16:2176–85, doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01526.x.
17. Rouzet F, Dominguez Hernandez M, Hervatin F, et al. Technetium 99m-labeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of experimental endocarditis. Circulation 2008;117:781–9, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.718114.
18. Augustin P, Alsalih G, Launey Y, et al. Predominant role of host proteases in myocardial damage associated with infectious endocarditis induced by Enterococcus faecalis in a rat model. Infect Immun 2013;81:1721–9, doi:10.1128/IAI.00775-12.
19. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, et al. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin Immunol Immunopathol 1990;57:250–62, doi:10.1016/0090-1229(90)90039-S.
20. Shiverick KT, Thomas LL, Alpert NR. Purification of cardiac myosin. Application to hypertrophied myocardium. Biochim Biophys Acta 1975;393:124–33, doi:10.1016/0005-2795(75)90222-6.
21. Watanabe K, Sukumaran V, Veeraveedu PT, et al. Regulation of inflammation and myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. Inflamm Allergy Drug Targets 2011;10:218–25, doi:10.2174/187152811795564091.
22. Sarda L, Colin P, Boccara F, et al. Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. J Am Coll Cardiol 2001;37:786–92, doi:10.1016/S0735-1097(00)01201-8.
23. Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with 99mTc-annexin V. J Nucl Med 2005;46:807–15.

24. Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, et al. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. Eur J Nucl Med 1999;26:1251–8, doi:10.1007/s002590050580.
25. Habib G, Hoen B, Tornos P, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. Eur Heart J 2009; 30:2369–413, doi:10.1093/eurheartj/ehp285.
26. Moon H, Park HE, Kang J, et al. Noninvasive assessment of myocardial inflammation by cardiovascular magnetic resonance in a rat model of experimental autoimmune myocarditis. Circulation 2012;125:2603–12, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075283.
27. Van Riet J, Hill EE, Gheysens O, et al. (18)F-FDG PET/CT for early detection of embolism and metastatic infection in patients with infective endocarditis. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010;37:1189–97, doi:10.1007/s00259-010-1380-x.
28. Vos FJ, Bleeker-Rovers CP, Sturm PD, et al. 18F-FDG PET/CT for detection of metastatic infection in gram-positive bacteremia. J Nucl Med 2010;51:1234–40, doi:10.2967/jnumed.109.072371.
29. Post AM, Katsikis PD, Tait JF, et al. Imaging cell death with radiolabeled annexin V in an experimental model of rheumatoid arthritis. J Nucl Med 2002;43:1359–65.
30. Wunder A, Schellenberger E, Mahmood U, et al. Methotrexate-induced accumulation of fluorescent annexin V in collagen-induced arthritis. Mol Imaging 2005;4:1–6.
31. Zhao Y, Zhao S, Kuge Y, et al. Attenuation of apoptosis by telmisartan in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-/- mice: evaluation using technetium 99mTc-annexin A5. Mol Imaging 2013;12:300–9.

2.2.2 Validation finale du kit clinique

Quelques excipients ont été modifiés pour la fabrication du kit clinique de l'Anx-A5-128. Ces modifications n'ayant pas été détaillées par le laboratoire, nous avons souhaité valider le kit dédié à la clinique dans le même modèle d'endocardite infectieuse chez le rat, en utilisant la même méthodologie (de radiomarquage, d'acquisition d'images scintigraphiques et autoradiographiques) que celui qui a été déjà réalisé lors de la validation pré-clinique, sur l'étude précédemment décrite (*121*). Nous avons donc intégré les valeurs de quantifications *in vivo* et en autoradiographie.

Il existait une fixation significative du radiotraceur sur les thrombi infectés au niveau valvulaire cardiaque et le long du cathétérisme chez les 6 rats du modèle d'endocardite. Aucune différence significative n'a été constatée avec les 2 produits entre les quantifications (R=T/B) réalisées *in vivo* (figure 11) et sur les coupes en autoradiographie (figure 12).

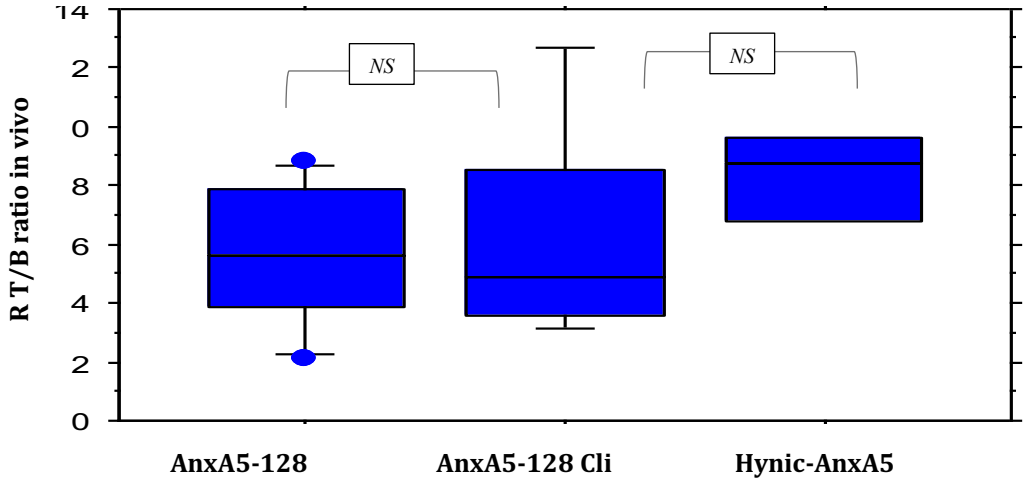


Figure 11 : Comparaison entre les rapports (R=T/B) des différents types d'annexines radiomarquées au ^{99m}Tc in vivo, sur les images TEMP/TDM.

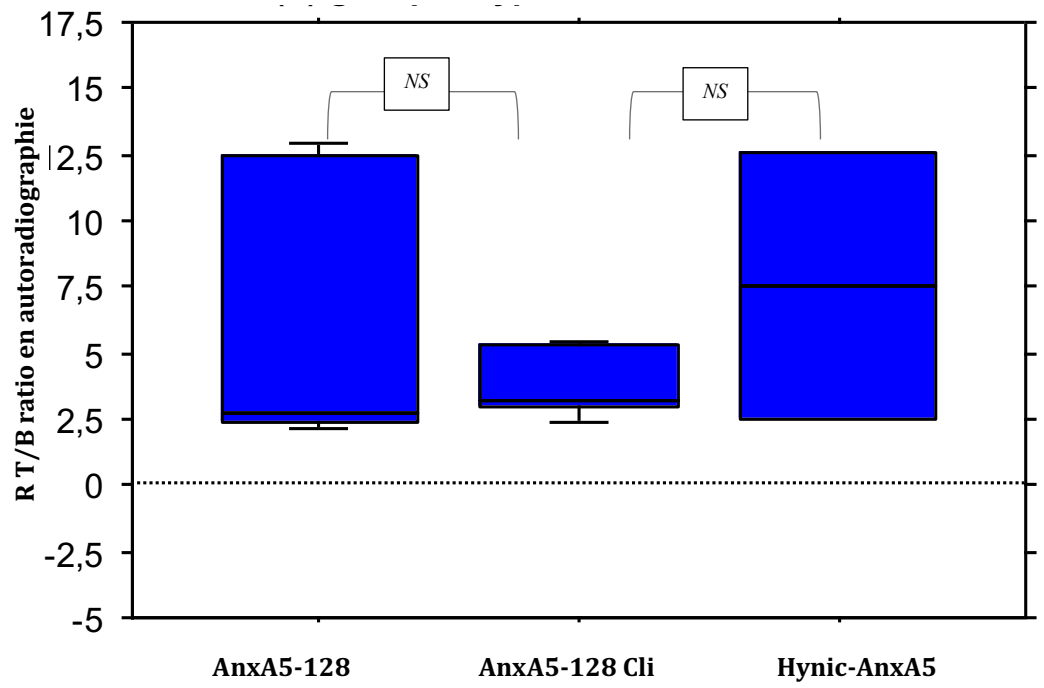


Figure 12: Comparaison entre les rapports (R=T/B) des différents types d'annexines radiomarquées au ^{99m} Tc en autoradiographie

Suite à ces résultats, et en l'absence de différence significative constatée dans les différentes quantifications *in vivo* et en autoradiographie, nous avons poursuivi la démarche vers la translation clinique.

3. TRANSLATION CLINIQUE

La recherche translationnelle est une activité aux interfaces entre recherches fondamentale et clinique, fluidifiant et accélérant les échanges bidirectionnels entre la recherche à visée cognitive et la recherche orientée vers les patients, ou la recherche à visée cognitive et la santé des populations . Cette recherche se caractériserait par son mode d'approche consistant en des échanges constants et réciproques entre les chercheurs, les fondamentalistes proposant aux cliniciens des outils nouveaux à utiliser pour les patients et les cliniciens faisant de nouvelles observations relatives à la maladie susceptibles en retour de stimuler la recherche fondamentale (*124*,*125*). Et, dans toutes ces présentations, l'objectif visé est sans conteste l'accélération et la progression de l'ensemble des actions engagées au bénéfice des malades, dans l'objectif clairement affiché de développer de nouveaux produits de santé.

Sur la base des données précliniques décrites ci-dessus concernant l'intérêt potentiel de la nouvelle forme GMP de l'AnxA5-128 radiomarquée dans les domaines cardiovasculaires et après validation pré-clinique de ce variant sur un modèle expérimental d'apoptose cellulaire (myocardite auto-immune) et d'activation plaquettaire (endocardite infectieuse), une étude translationnelle a été mise en place pour apporter la preuve de concept clinique de la pertinence de cette imagerie moléculaire du thrombus.:

Évaluation de l'AnxA5-128 radiomarquée dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse, du thrombus atrial et de leurs complications emboliques associées.

3.1 JUSTIFICATION DE L'ESSAI - HYPOTHESES DE TRAVAIL :

Les thrombi artériels (ILT) adhérant aux valves cardiaques (végétations), à l'oreillette gauche ou à la paroi des anévrysmes de l'aorte abdominale, procèdent d'une physiopathologie commune dont témoigne la présence de plaquettes activées associées à une expression intense de la PS sur la couche luminale du thrombus. Ils partagent aussi les mêmes complications: dégradation du tissu sous-jacent et risque embolique consécutif à la fragmentation du thrombus. La stratégie diagnostique, actuellement basée sur l'imagerie morphologique seule (principalement échographique), n'est pas satisfaisante car elle manque de sensibilité et ne permet pas de différencier un thrombus actif (activité biologique de renouvellement) d'un thrombus quiescent (cicatrisé). Il est par conséquent fortement souhaitable de développer une nouvelle approche non invasive capable de

renseigner sur l'activité biologique de l'ILT, et de détecter les éventuelles complications emboliques dans le même temps et en un seul examen. Ceci permettra éventuellement d'évaluer précocement l'efficacité thérapeutique.

3.1.1 Endocardite infectieuse (EI)

3.1.1.1 Introduction

L'EI comporte un risque élevé de morbidité et de mortalité allant jusqu'à 30% (*36, 127–129*). Un diagnostic rapide, un traitement efficace et une reconnaissance rapide des complications sont essentiels à une évolution favorable de la maladie. Les microorganismes les plus incriminés sont les bactéries. Il convient de mentionner que 30% des cas d'EI sont associés aux soins de santé (*129*). Le mauvais pronostic des patients souffrant d'EI est, entre autres, dû à la présentation clinique non spécifique et à l'absence de paramètres de laboratoire typiques détectant la maladie en l'absence d'hémocultures positives (*130*). En conséquence, il y a une latence diagnostique significative de 29 ± 35 jours et un séjour hospitalier moyen de 42 ± 29 jours (*128*). Une fois l'EI diagnostiquée, le pronostic des patients est déterminé par l'apparition de complications. Karth et coll. ont pu identifier l'insuffisance cardiaque grave (64%), le choc septique (21%) et les complications neurologiques (15%) comme les trois principales raisons d'admission en soins intensifs chez les patients atteints d'EI.

Alors que la maladie était principalement limitée aux patients relativement jeunes souffrant d'infections rhumatismales à streptocoques (*127*,*129*), de nouvelles catégories à risque d'infections à *Staphylococcus aureus* sont apparues ces dernières années. Les principales causes de l'EI des sujets âgés sont : la résistance aux médicaments, les traitements intensifs telles que l'hémodialyse, l'immunosuppression, les cathéters veineux centraux mais aussi les implants cardiaques et les prothèses valvulaires qui ont conduit à des incidences émergentes de l'EI à *S. aureus* (*36, 40, 129, 132–136*).

Dans une étude française publiée récemment sur le contexte microbiologique de l'EI, 497 patients ont été étudiés et le *S. aureus* a été identifié dans 26,6% des cas par rapport aux staphylocoques à coagulase négative (9,7%), aux streptocoques oraux (18,7%) et aux streptocoques non oraux (17,5%)(*129*).

3.1.1.2 Les modalités diagnostiques de l'endocardite infectieuse

Le diagnostic d'EI est simple chez les patients présentant des manifestations oslériennes classiques : bactériémie ou fungémie, végétation valvulaire active, embolie septique périphérique et phénomènes vasculaires immunologiques. Cependant, chez d'autres

patients, les stigmates périphériques classiques peuvent être rares ou absents, comme lors de l'EI aigue, plus fréquente chez les patients toxicomanes, qui développent préférentiellement une endocardite du cœur droit à *S. aureus*, ou chez les patients atteints d'une EI à hémocultures négatives causée par les micro-organismes du groupe HACEK (Hemophilus parainfluenzae, Hemophilus aphrophilus, Actinobacillus [Hemophilus] actinomycetemcomitans, Cardiobacterius hominis, Eikenella species, et Kingella species) (*136*).

La variabilité de la présentation clinique de l'EI requiert une stratégie diagnostique qui doit être à la fois sensible et spécifique de la maladie.

Le score de Duke, incluant des critères cliniques, biologiques et de l'imagerie morphologique (échographie trans-thoracique et /ou trans-oesophagienne, une TDM et une IRM à la recherche d'embole septique) initialement destiné à la recherche clinique, présente des limites dues en particulier à la variabilité de la présentation clinique de la maladie.

En effet, d'une part il nécessite la détection des végétations et/ou des lésions valvulaires ; élément crucial du diagnostic requérant une échographie trans-thoracique et le plus souvent trans-oesophagienne. Cependant, l'échographie ne montre pas d'anomalie spécifique dans environ 10% des cas d'endocardite certaine, et a de mauvaises performances dans les EI sur prothèses valvulaires.

D'autre part il faut également une détection précoce des complications emboliques. Ceci a un impact sur (*128, 137*) : 1/ le diagnostic, car la présence d'emboles est un critère majeur du score de Duke, 2/ le pronostic et le traitement, car la présence d'emboles peut représenter une indication à un traitement chirurgical à la phase aiguë de la maladie.

Ces emboles qui sont cliniquement silencieux dans au moins 20 à 30% des cas, sont détectés uniquement par l'imagerie (scanner et IRM). La recherche de complications emboliques telle qu'elle est réalisée actuellement n'est pas satisfaisante en raison de la multiplicité des examens, à l'origine d'une perte de temps risquant d'amener à sous-estimer la gravité initiale de la maladie.

Il est par conséquent fortement souhaitable de développer une nouvelle approche non invasive capable de renseigner sur l'activité biologique du thrombus intra-luminal et de détecter les éventuelles complications emboliques dans le même temps et en un seul examen.

Les examens d'imagerie moléculaire scintigraphiques apparaissent comme des méthodes complémentaires importantes pour les patients avec suspicion clinique d'endocardite

infectieuse et présentant des difficultés diagnostiques. Et ce, grâce également au développement des nouvelles caméras hybrides : la TEMP/TDM en imagerie nucléaire conventionnelle et la TEP/TDM, qui permettent d'associer les informations anatomiques et fonctionnelles.

Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs des scintigraphies aux leucocytes marqués et de la TEP/TDM au ^{18}F-FDG dans la prise en charge de l'EI (*137–142*).

L'imagerie TEMP/TDM repose sur l'utilisation de leucocytes radiomarqués (^{111}In-oxine ou ^{99m}Tc-hexamethylpropylène amine oxime) qui s'accumulent en fonction du temps dans les images tardives (24H post injection) par rapport aux images précoces (réalisées à 4h). L'imagerie TEP/TDM au ^{18}F-FDG consiste en l'injection d'un analogue glucidique, le fluodésoxyglucose, consommé préférentiellement par les cellules inflammatoires et infectieuses notamment macrophagiques, permettant ainsi la détection des sites infectieux/inflammatoires, mais sans discrimination. La scintigraphie aux leucocytes marqués est plus spécifique que la TEP au ^{18}F-FDG dans la détection de l'EI et des foyers infectieux (*137*,*140*). Toutefois, elle présente des inconvénients : 1) nécessite la manipulation de dérivés du sang, 2) se fait sur une durée de deux jours d'examens après une longue procédure de séparation et de marquage des leucocytes, 3) La résolution de la TEMP est légèrement inférieure à celle de la TEP, 4) Enfin, vu les faibles doses injectées et la demi-vie de 6h du ^{99m}Tc, l'obtention d'une image résolue nécessite une durée d'acquisition plus longue, ce qui est un paramètre qui restreint les champs d'acquisition en pratique courante. C'est donc une technique qui ne permet pas un bilan lésionnel complet des foyers septiques, dans la pratique courante.

D'un autre côté, la TEP/TDM est généralement réalisée en utilisant une seule acquisition à 1h après administration du^{18}F-FDG, qui est activement incorporé *in vivo* par des leucocytes activés, des monocytes, macrophages et les lymphocytes T CD4 + s'accumulent sur les sites d'infection. La TEP est un moyen d'exploration sensible, qui permet de contribuer au diagnostic de l'atteinte infectieuse valvulaire, en particulier sur matériel prothétique (*143*), à la recherche des emboles septiques (*144*,*145*) et d'une éventuelle porte d'entrée de l'EI (*145–148*).

La principale valeur ajoutée de l'utilisation de ces techniques est la réduction du taux d'EI classée dans la catégorie «Possible EI» en utilisant les critères de Duke grâce à la détection d'emboles périphériques et/ou d'infections métastatiques. Dans les recommandations européennes de prise en charge de l'endocardite infectieuse (classification de Duke-Li modifiée en 2015), la TEP au ^{18}FDG et la scintigraphie aux leucocytes marqués font

maintenant partie des critères majeurs de diagnostic d'endocardite infectieuse (*128*). Un autre rôle prometteur supplémentaire de la TEP au ^{18}F-FDG est l'évaluation de la réponse thérapeutique. Cependant, des données disponibles ne sont pas encore suffisantes actuellement pour formuler une recommandation générale.

Toutefois, la TEP/TDM au ^{18}F-FDG, présente également des limites. Elle ne permet pas de mettre en évidence d'une manière évidente un embole septique au niveau cérébral en raison de la fixation physiologique du traceur. La réalisation d'images tardives à 180 min post injection (*149*) pourrait augmenter la sensibilité de détection. Toutefois l'IRM reste la modalité de référence pour le cerveau (*150–154*). En outre, à défaut du respect d'un régime pauvre en hydrates de carbone et riche en protéines permettant l'extinction de la fixation physiologique du ^{18}FDG au niveau myocardique, l'interprétation du plan valvulaire cardiaque n'est pas optimale. A ce fait, se surajoutent deux autres éléments : le mouvement vibratile de la valve au cours du cycle cardiaque d'une part et la taille de la végétation (inférieure à la résolution spatiale de la caméra), d'autre part. Tous ces facteurs peuvent diminuer de la sensibilité de l'examen.

Une attention particulière doit être exercée lors de l'interprétation de la TEP/TDM au ^{18}FDG chez les patients qui ont récemment subi une chirurgie cardiaque car une réponse inflammatoire post opératoire peut entraîner des faux positifs de l'examen (*138*).

Enfin ces deux techniques d'imagerie nucléaire ne permettent pas la mise en évidence de la végétation stérile faite uniquement d'un thrombus fibrino-plaquettaire avant la colonisation bactérienne. De ce fait, il est important de continuer la recherche de techniques d'imagerie moléculaire non invasives, permettant la mise en évidence de ce thrombus actif. D'où l'intérêt porté à l'AnxA5-128 radiomarquée au ^{99m}Tc.

3.1.2 Thrombus atrial (TA)

L'oreillette gauche, et plus particulièrement l'auricule gauche, est la localisation la plus fréquente des thrombi intracardiaques. Certaines études sur la fibrillation atriale chronique ont rapporté la présence d'un TA chez environ 10% des patients (*155*). Le risque de TA est augmenté lorsque la fibrillation atriale est associée à une autre cardiopathie, en particulier une sténose mitrale, où sa prévalence varie de 10 à 40% (*156*). Comparé à l'endocardite et à l'anévrysme de l'aorte abdominale, les TA présentent un risque élevé d'embolie, particulièrement cérébrale, mais une moindre dégradation tissulaire en raison de la faible pression sanguine dans l'oreillette gauche. L'échographie trans-œsophagienne (ETO) est la méthode de référence pour diagnostiquer un TA, en particulier lorsque celui-ci siège dans

l'auricule gauche car dans ce cas la sensibilité est de 100% (*156*). La spécificité de l'ETO est estimée entre 95 et 100%. Son principal inconvénient est d'être une procédure semi-invasive nécessitant une sédation. Elle peut être contre-indiquée en cas de maladie de l'œsophage ou d'insuffisance respiratoire. Les principales situations cliniques dans lesquelles l'ETO est indiquée pour détecter un TA sont : la recherche d'une origine cardiaque à un événement embolique, le bilan avant cardioversion chez des patients en fibrillation atriale et ayant un traitement anticoagulant insuffisant, et l'évaluation avant une valvuloplastie percutanée dans la sténose mitrale. La présence d'un TA est une contre-indication, au moins provisoire, à la cardioversion et à la valvuloplastie mitrale percutanée. La possibilité de détecter un TA grâce à une méthode non-invasive est donc séduisante, en particulier pour les patients présentant une contre-indication à l'ETO ou ayant une faible probabilité pré-test de TA.

3.2 OBJECTIFS DE L'ESSAI CLINIQUE

3.2.1 Objectif principal

L'objectif principal est d'évaluer la sensibilité du radiotraceur AnxA5-128 dans la détection des thrombi intra-luminaux (ILT), comparativement à l'imagerie de référence, pour l'ensemble des patients présentant l'une des deux situations cliniques suivantes : 1/ endocardite infectieuse, ou 2/ thrombus atrial.

3.2.2 Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Évaluer la tolérance de l'AnxA5-128 radiomarquée dans le cadre de la première phase de l'étude (réalisée chez les 10 premiers patients inclus : groupe 1).
- Évaluer la sensibilité du radiotraceur l'AnxA5-128 dans la détection des ILT, comparativement à l'imagerie de référence dans chacune des deux pathologies prise séparément.
- Évaluer la spécificité du radiotraceur l'AnxA5-128 dans la détection des végétations endocarditiques en comparaison avec l'échographie trans-oesophagienne.
- Évaluer la sensibilité et la spécificité du radiotraceur AnxA5-128 dans la détection des emboles périphériques symptomatiques ou asymptomatiques secondaires à la fragmentation des ILT, comparativement à l'angiographie IRM cérébrale et/ou le scanner abdomino-pelvien (ou thoracique) avec injection de produit de contraste, dans les 2 situations cliniques (EI et TA) (*104*).

RESUME DE L'ETUDE:

Les ILT adhérant aux valves cardiaques (végétations), à l'oreillette gauche ou à la paroi des anévrysmes de l'aorte abdominale procèdent d'une physiopathologie commune dont témoigne la présence de plaquettes activées associées à une expression intense de la PS sur la couche luminale du thrombus. Ils partagent aussi les mêmes complications : dégradation du tissu sous-jacent et risque embolique consécutif à la fragmentation du thrombus. La stratégie diagnostique, actuellement basée sur l'imagerie morphologique seule (principalement échographique), n'est pas satisfaisante car elle manque de sensibilité et ne permet pas de différencier un thrombus actif (activité biologique de renouvellement) d'un thrombus quiescent (cicatrisé). Il est par conséquent fortement souhaitable de développer une nouvelle approche non invasive capable de renseigner sur l'activité biologique de l'ILT, et de détecter les éventuelles complications emboliques dans le même temps et en un seul examen.

L'AnxA5 est un ligand endogène de la PS d'affinité nanomolaire. Cette glycoprotéine de 36 kDa couplée au ^{99m}Tc, peut être utilisée *in vivo* pour détecter l'expression de la PS dans l'apoptose ou l'activation plaquettaire. La biodistribution de ce radiotraceur a été étudiée sur des modèles murins et chez l'homme (variant ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5 chez l'homme). Notre groupe a montré que l'AnxA5 radiomarquée est capable de fournir une imagerie moléculaire de l'activation plaquettaire dans le thrombus artériel associé à l'anévrysme de l'aorte abdominale in vivo chez l'animal et ex vivo chez l'homme. Nous avons ensuite montré qu'elle permettait de détecter les végétations endocarditiques chez l'animal (rat et lapin) avec une excellente sensibilité, ainsi que les emboles septiques pulmonaires.

Un kit de radiomarquage de l'annexine répondant aux normes GMP et ayant l'agrément de médicament expérimental est actuellement disponible (Advanced Accelerator Applications - AAA). AnnIE est une étude monocentrique, interventionnelle, de preuve de concept, ouverte, non randomisée, ayant pour objectif d'évaluer la sensibilité ^{99m}Tc-AnxA5-128 dans la détection des ILT, comparativement à l'imagerie de référence, pour l'ensemble des patients présentant l'une des 2 situations cliniques suivantes : 1/ endocardite infectieuse, ou 2/ thrombus atrial. La tolérance de la ^{99m}Tc-AnxA5-128 sera évaluée dans une première phase (10 premiers patients inclus : groupe 1). Les données relatives à la tolérance de l'agent d'imagerie obtenues chez ces patients seront évaluées par un comité de surveillance indépendant ; En cas de réponse positive du comité, l'étude se poursuivra avec la deuxième phase (groupe 2). Les données obtenues chez l'ensemble des patients (groupe 1 et 2) seront

utilisées pour répondre aux critères de jugement concernant les performances diagnostiques.

Mots clés (5) : Imagerie – Cardiovasculaire – Thrombus – Endocardite Infectieuse – SPECT

3.3 ETAPES ADMINISTRATIVES DE LA MISE EN PLACE DE L'ESSAI

3.3.1 Financement de l'étude :

Ce projet est financé par l'INSERM (Institut National de la Santé (38,5%), DHOS (38,5%) et AAA (23%). Un budget total de 130000 euros a été prévu pour cette étude. Ce projet est mené en collaboration avec le centre d'investigation clinique (CIC).

3.3.2 Avis du Comite de Protection des Personnes (CPP)

Ce dossier est composé : 1/ d'un dossier administratif comportant un courrier et un formulaire de demande d'avis, 2/ d'un dossier sur la recherche biomédicale (RBM) comportant le protocole, un résumé du protocole, la brochure investigateur, un résumé des caractéristiques du produit, un document d'information destiné aux participants, un formulaire de recueil de consentement, une copie de l'attestation d'assurance, un avis du comité scientifique, une justification de l'adéquation des moyens humains, matériels et techniques avec la sécurité des participants**.**

L'avis favorable du CPP a été délivré en avril 2015. Numéro de dossier 2015-Fev-13818

3.3.3 Avis de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament

Un dossier de demande d'AEC (autorisation d'essai clinique) a été soumis à l'ANSM (agence nationale de sécurité du médicament) se composant de 4 parties :

I : Dossier administratif (DA)

Il comporte un courrier de demande d'autorisation d'essai clinique, une fiche intitulée « Répertoire public des essais cliniques autorisés –Informations sur l'essai », un formulaire de demande d'attestation en vue d'une importation de médicaments nécessaires à la réalisation de la recherche, un formulaire de déclaration d'une collection d'échantillons biologiques humains, un formulaire de demande d'autorisation d'essai clinique (FAEC), un formulaire de demande d'essai clinique, la liste des investigateurs, une copie du reçu de confirmation du numéro EudraCT émis par l'application EudraCT, la liste des autorités compétentes sollicitées/ nature de leurs décisions, une autorisation écrite permettant au

demandeur d'agir pour le compte du promoteur, une copie des autorisations requises pour la mise en place de l'essai ou pour l'utilisation du médicament expérimental, un avis scientifique sur le médicament expérimental ou sur l'essai, une autorisation du tiers propriétaire des données relatives au médicament expérimental.

II : Dossier sur l'essai clinique (DEC)

Il comporte le protocole de l'essai clinique, le résumé du protocole, la brochure pour l'investigateur (BI) et/ou le résumé des caractéristiques du produit (RCP), une copie d'attestation d'assurance, un avis du comité scientifique (« peer review »), un document de référence permettant de déterminer le caractère attendu ou inattendu de (des) effet(s) indésirable(s) grave(s).

III : Dossier technique relatif aux produits utilisés (DT)

Il comporte un dossier du médicament expérimental (DME), où figurent les données relatives à la qualité pharmaceutique chimique et biologique, les données non cliniques, une analyse critique de l'évaluation des bénéfices et des risques, le dossier du médicament non expérimental (DMNE), et enfin un dossier relatif à tout autre produit.

IV : Avis du comité de protection des personnes : 2015-Fev-13818

L'ensemble des éléments nécessaires à ce dossier ont été rédigés et transmis à l'ANSM le 28 /11/2014 ;

Une réponse favorable avec une autorisation à conduire cet essai clinique a été délivrée le 29/05/2015 (n° EudraCT 2014-004260-38), numéro de référence ANSM 150121A-12.

3.4 RESULTATS D'ETUDE DE LA TOLERANCE

Rapport de la première partie de l'étude clinique :

Nous avons rédigé un rapport sur la première partie de l'essai clinique réalisé chez un groupe 1, de patients avec suspicion d'endocardite infectieuse selon les critères de Duke modifiés. Une étude de tolérance, de dosimétrie et un traitement des premières données scintigraphiques ainsi qu'une discussion de ces résultats préliminaires ont été établis et rédigés.

Les principales conclusions de cette première partie de l'étude est que l'^{99m}Tc-AnxA5-128 est bien tolérée, qu'aucun effet secondaire n'a été rapporté, qu'aucune valeur ou changement significatif n'a été noté dans les paramètres biologiques. De plus, les résultats préliminaires sont prometteurs concernant la détection de l'endocardite infectieuse.

PHASE I/II STUDY OF ^{99m}TC-ANNEXIN A5-128: SAFETY, BIODISTRIBUTION, DOSIMETRY AND PRELIMINARY RESULTS IN INFECTIVE ENDOCARDITIS (NCT02459613)

PRELIMINARY REPORT

Experimental drug	^{99m}Tc-rhAnnexin V-128
EudraCT N°	2014-004260-38
Sponsor *Validé le* *Signature:*	Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) **Hélène Espérou** Responsable du Pôle de Recherche Clinique 8, rue de la croix Jarry - 75013 Paris - France Pharmacovigilance : **Responsable de Pharmacovigilance : Dr. Alpha DIALLO** Tél : 01 53 94 60 45 **Chargée de pharmacovigilance référente de l'essai : Séverine GIBOWSKI** Tél : 01 53 94 60 08 - Fax : 01 53 94 60 02 Courriel : ec.vigilance@anrs.fr
Coordinator	**Pr Dominique LE GULUDEC** Service de Médecine Nucléaire, GH Bichat Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18 Tél: 01 40 25 84 10 – Fax: 01 40 25 64 00 Courriel: domnique.leguludec@bch.aphp.fr

Competent authority	**ANSM**
Registration number	**N° 150121A-12**
Date of approval	**28/05/2015**
Ethics Committee	**Ile de France VI**
Registration number	**2015-fév.13818**

1

List of abbreviations

%ID	percentage of the Injected Dose
^{99m}Tc	Technetium-99m
ADA	Anti-drug Antibodies
AEs	Adverse Events
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament (Comptent authority)
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
CPP	Comité de Protection des Personnes (Ethics Committee)
CT	Computed Tomography
DSMB	Data Safety Monitoring Board
FDG	Fluorodeoxyglucose
GMP	Good Manufacturing Practice
Gy	Gray
HYNIC	Hydrazinonicotinamide
IAF	injected activity fractions
IE	Infective endocarditis
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
MBq	Mega-Becquerel
mCi	milli-Curie
MRI	Magnetic Resonance Imaging
OD	Optical Density
PET	Positron Emission Tomography
PBS	Phosphate-buffered saline
RCP	Radiochemical Purity
SAEs	Severe Adverse Events
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
Sv	Sievert
TAVI	TransArterial Valve Implantation
TBR	Target to background ratio

List of Tables

Table 1: Safety parameters 12
Table 2: Safety parameters (continued) 13
Table 3: Characteristics of the study population (n=10) 14
Table 4: Blood clearance of ^{99m}Tc-Anx 128 16
Table 5: Mean injected fraction value / per organ and per time 17
Table 6: Correlations between ^{99m}Tc-Anx 128 activity and biological parameters. 18
Table 7: Absorbed dose (D) / effective dose (E) 19
Table 8: Summary of 99mTc-Anx SPECT diagnostic performance. 22
Table 9: Relationship between 99mTc-Anx 128 blood-pool activity and selected biological parameters 27
Table 10: Safety - Clinical parameters 28
Table 11: Safety - Biological parameters 29
Table 12: Causes and imputability of Adverse Events 31

List of Figures

Figure 1: Study flow chart.... 8
Figure 2: Blood clearance of ^{99m}Tc-Anx 128.... 15
Figure 3: Uptake as a function of time for selected organs.... 17
Figure 4: Whole body 99mTc-Annexin V128 scintigraphy.... 18
Figure 5: Follow up of vital signs from Baseline to the 24h post injection.... 20
Figure 6: 99mTc-Anx 128 uptake of aortic prosthetic valve.... 23
Figure 7: 99mTc-Anx128 uptake of the posterior tibial artery.... 23
Figure 8: 99mTc-Anx 128 uptake of native mitral valve.... 24
Figure 9: Safety - Biological parameters (individual changes).... 30

Table of Contents

1 Introduction 6
2 Materials & Methods 7
2.1 Study population 7
2.2 Study Flow Chart 7
2.3 Radiolabelling procedure 8
2.4 Scintigraphy procedure 9
2.5 Dosimetry 9
2.6 Images Analysis 11
2.7 Safety Parameters 11
2.8 Immunogenicity 13
2.9 Statistical analysis 13
3 Results 14
3.1 Study population 14
3.2 Biodistribution 14
3.3 Dosimetry 19
3.4 Safety 19
3.5 Detection of vegetations in infective endocarditis 21
4 Conclusion 24
5 Bibliography 25
6 Annexes 27

1 Introduction

Infective endocarditis (IE) carries a high risk of morbidity and mortality.[1] Rapid diagnosis, effective treatment and prompt recognition of complications are essential to improve patients' outcomes. Mortality is related to hemodynamic complications secondary to valvular lesions, thromboembolism due to vegetative fragmentation, and uncontrolled sepsis due to the persistence of the infection.[2,3] The diagnosis of IE may be difficult to establish and a strategy that combines clinical, microbiological and imaging results has been standardized in the modified Duke-Li criteria.[4] Hybrid imaging devices, new contrast agents and radiolabeled probes are at the leading edge of imaging research in the clinical setting, particular concerning serious disease as the EI.

In this context, our group developed molecular imaging of phosphatidylserine (PS) by Annexin A5 in cardiovascular diseases. Annexin A5 is an endogenous ligand of PS with nanomolar affinity. This 36-kDa glycoprotein coupled to ^{99m}Technetium (^{99m}Tc) can be used in vivo to detect PS expression in apoptosis or platelet activation.[5,6] The biodistribution of this radiotracer has been assessed in murine models and in humans[7,8] (variant 99mTc-HYNIC-Annexin A5 in humans). Our group has shown that radiolabelled Annexin A5 is able to provide molecular imaging of platelet activation in arterial thrombi associated with abdominal aortic aneurysm in vivo in animals and ex vivo in humans.[9] We also showed that it allowed detecting the endocarditic vegetations in animals (rat and rabbit) with an excellent sensitivity, as well as pulmonary septic emboli.[10] Endocardial thrombotic vegetation represents a specific model of pathogen/host tissue interaction, involving the formation of a septic thrombus leading to injury of both underlying valvular and cardiac tissue and to possible peripheral septic dissemination.[10,11] Pathogen/platelet molecular interactions are probably one of the main determinants of vegetation formation and growth that promote septic thrombus formation, including platelet activation and aggregation and fibrin-fibronectin deposition. [12,13]

Based on preclinical studies pertaining to potential interest of radiolabelled annexin V in the cardiovascular, oncological and inflammation domains, Advanced Accelerator Applications (AAA) laboratory developed the production of Annexin A5-128 radiolabelling kits with 99mTc (Annexine A5-128) complying with GMP standards. A phase I study of safety, tolerance, pharmacokinetics and nuclear medicine imaging of ^{99m}Tc-Annexin A5-128 (Anx128) administered intravenously in healthy adult volunteers had been conducted in 10 healthy volunteers [Investigator's brochure].

After a preclinical validation of this GMP form of annexin,[14] we initiated a phase I/II study of safety, tolerance and biodistribution of annexin A5128 and of proof of concept in patients with infective endocarditis (IE) and atrial thrombus.

2 Materials & Methods

2.1 Study population

Enrollment

Inclusion criteria:

- ≥18-year-old
- stable clinical status
- informed consent obtained
- contraception in women of childbearing potential
- definite ou possible endocarditis (modified Duke-Li criteria)

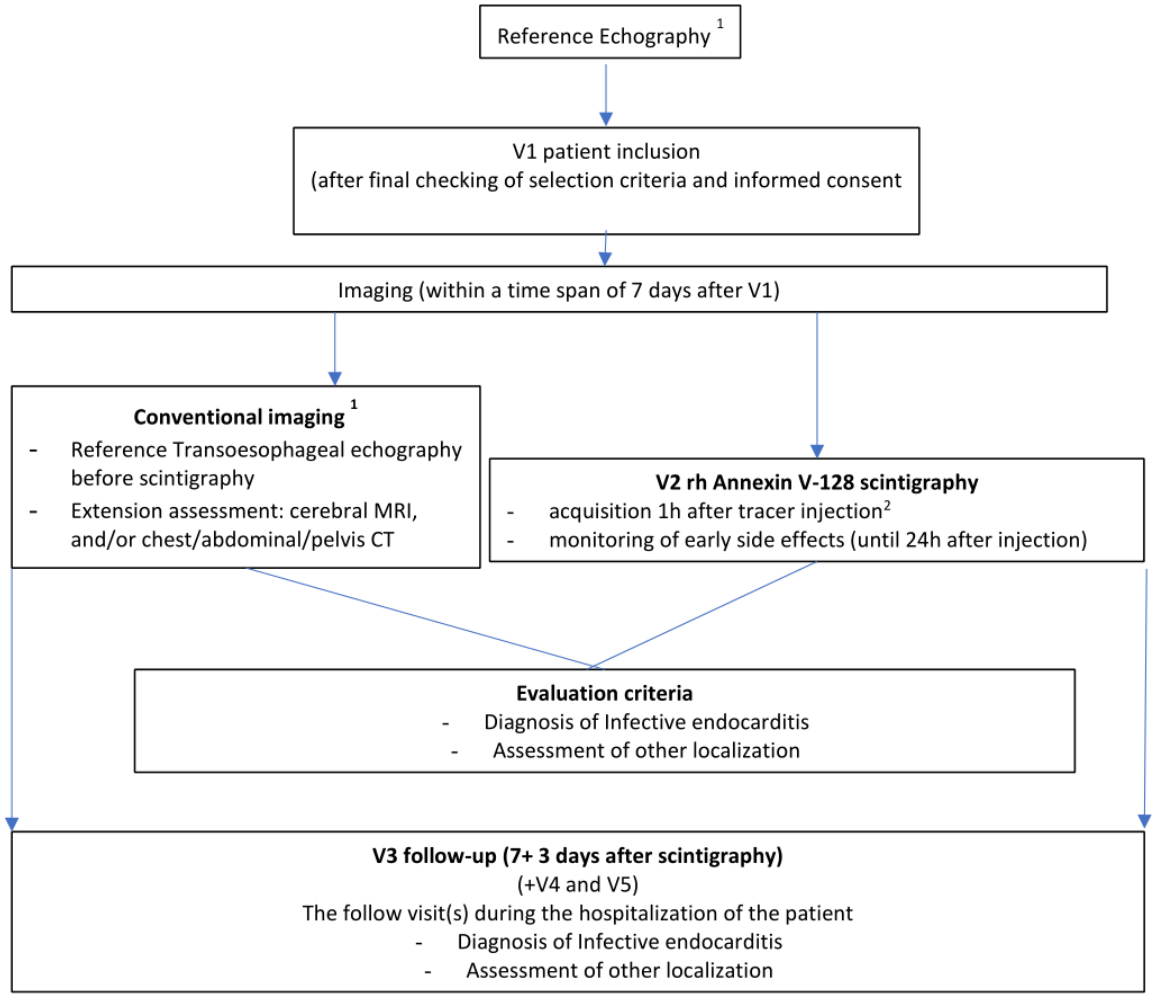
Exclusion criteria:

- pregnant or lactating women
- contra-indication to both MRI and CT
- history of cardiac surgery in relation with the current episode
- (effective) antibiotic regimen for more than 15 days

2.2 Study Flow Chart

This was a phase I, nonrandomized, open-label, single-dose study. The study was approved by the ethics committee (CPP), and by the competent authority (ANSM). The Flow Chart is presented Figure 1.

Figure 1: Study flow chart



[1] Scan performed in a healthcare setting/ in the research setting if >7days after inclusion or if embolic phenomenon occurred

[2] For group 1, additional imaging is realized 30min, 3H, 6h and 24h after injection.

2.3 Radiolabelling procedure

Good manufacturing practice–grade human recombinant Annexin A5-128 kits were provided by AAA-GiPharma lab. The single dose vial was reconstituted with 2 mL ± 0.2 mL ^{99m}Tc eluate containing up to 740 MBq ± 74MBq (20 mCi ± 2mCi).

The technetium eluate used for the labelling of Anx128 kits was obtained from commercially available Drytec^{TM} generators. The Radiochemical Purity (RCP) was checked according to the manufacturer's recommendations using ITLC. Three eluents were used as follows: Acetone 100% (Tc-99m, Rf=1.0); ACD (^{99m}Tc-Anx128, Rf=0.0); PBS (^{99m}Tc-Glucoheptonate, Rf=1.0

8

and ^{99m}TcO2, Rf=0.0). The RCP was calculated by integration of ^{99m}Tc-Anx128 peak that should be ≥ 90.0%; sum of ^{99m}Tc-Glucoheptonate + ^{99m}Tc-free + ^{99m}TcO2 should be ≤ 10% (where sum of ^{99m}Tc-free + 9^{9m}TcO2 must be ≤ 8.0% and ^{99m}Tc-glucoheptonate should be ≤ 10.0%). A dose of 370 MBq of the reconstituted solution has to be administrated within 30 minutes after completion of the labelling procedure.

2.4 Scintigraphy procedure

^{99m} Tc-Annexin A5-128 scanning was performed using a dual-head gamma camera equipped with low-energy, high resolution collimators SIEMENS Symbia T2 (Siemens Medical Solution Inc., IL, USA). In all studies, the energy peak was set at 140 keV with a 15% energy window. Whole-body scans, with table speed of 8 cm/min and automatic body contour, were acquired at 30min, 1, 3, 6, and 24 h after injection. SPECT/CT (single-photon emission computed tomography/computed tomography) data were acquired with a noncircular 180° acquisition for 64 projections at 55s per projection (128x128 matrix). Images were reconstructed with ordered set expectation maximization iterative algorithms Flash3D (4 iteration, 4 subsets). The reconstructed voxel size was 4.8 × 4.8 × 4.8 mm. A low-dose CT was also acquired for attenuation correction (130 kV, 17 mAs, pitch 1., Slice thickness 3 mm). Images were reconstructed with and without attenuation correction for further analysis.

2.5 Dosimetry

As described above whole-body planar images were performed at 30min, 1h, 3h, 6h and 24h after injection. The image at 30 min was acquired before urination. Total body retention was estimated using the no-excretion approach ,[15] that is, the total counts collected during the first whole-body scan were assumed to correspond to the total injected dose. Total counts from a later whole-body scan at time t_i can be used to estimate total body uptake, or percentage injected dose (%ID), according to uptake (t_i) scan) 100%. For blood clearance assessment, a bi-compartmental model has been fitted using the Levenberg-Marquardt algorithm (R software). The analysis of biodistribution was carried out at each point on the following organs: liver, spleen red marrow, kidneys, thyroid, testes and the whole body. Counts in this expression are the geometric mean of the anterior and posterior views. To determine organ uptake, regions of interest were defined for all organs showing noticeable uptake. The same regions were used in all images of a given patient, both copying and mirroring the regions thus required. These regions of interest were performed using OsiriX software (version 9.5.1). Uptake in the red

marrow was derived from activity found in the iliac crests, using the estimate of Buijs et al. that about 4.4% of all red marrow is present in these locations.[16]

In addition, blood samples were taken 30 min, 1h, 3h, 6h and 24h after injection to measure clearance of ^{99m}TcAnx128 in whole blood and plasma by well counting (Wizard 3", PerkinElmer). Urines were collected during the first 24 hours to measure total excretion.

Biodistribution analysis:

The injected activity fractions (IAF) were calculated for each patient at each time t by calculating the ratio between the number of counts in the organ at time t and the number of whole body counts at t = 0. The average biodistribution was calculated by averaging the IAF at each t as well as the standard deviation.

Modeling of pharmacokinetics

Pharmacokinetics was modeled for each organ using mono and bi-exponential models).

$$f_1(t) = A_1 e^{-\lambda_1 . t} \qquad f_3(t) = A_1\left[e^{-\lambda_1 . t} - e^{-\lambda_2 . t}\right]$$

$$f_2(t) = A_1 e^{-\lambda_1 . t} + A_2 e^{-\lambda_{phys} . t} \qquad f_4(t) = A_1 e^{-\lambda_1 . t} + A_2 e^{-\lambda_2 . t}$$

The adjustment of the functions was carried out with the R software and the Levenberg-Marquardt algorithm. At each adjustment, the residuals were calculated, as well as the standard errors associated with the function parameters. The integrated activity coefficient, equivalent to the residence time, was thus calculated from the adjustment parameters according to each function:

$$f_1 : \tilde{a}_1 = \frac{A_1}{\lambda_1} \qquad f_3 : \tilde{a}_3 = A_1\left[\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2}\right]$$

$$f_2 : \tilde{a}_2 = \frac{A_1}{\lambda_1} + \frac{A_2}{\lambda_{phys}} \qquad f_4 : \tilde{a}_4 = \frac{A_1}{\lambda_1} + \frac{A_2}{\lambda_2}$$

Dosimetry calculations

The dose calculations were performed with OLINDA V2.0 software.[17] The integrated activity coefficients were used in input data with the anatomical model ICRP 89.[18] The "body remainder" compartment was determined by calculating the difference between the body-integer integrated coefficient of activity and the sum of the coefficients of the organs.

2.6 Images Analysis

We compared the signal measured on the right atrium to the blood count, 90 min after tracer injection. After checking similarity between in vitro counts of the blood and the mean counts in ROI (region of interest) drawn on the cardiac area, we correlated the blood counts on image to the biologic parameter.

The target to background ratio on the deltoid muscle was TBR=mean counts T/mean counts B was performed on the SPECT/CT reconstructed images realized on the thoracic region, between 1h30 and 2h30 after tracer injection.

2.7 Safety Parameters

To determine the safety of ^{99m} Tc-Annexin A5-128, blood samples were collected (renal and liver function, biochemistry, hematology, and blood coagulation parameters). The blood samples were taken at baseline (immediately prior to ^{99m} Tc-Annexin A5-128 administration) for antibody anti-annexin dosages, for dosimetry study and for hematology and chemistry tests. Then at the following time-points: 5, 30, 90 min, 3 h, 6 h and 24 hours post-administration for dosimetry study. The 24h post injection blood sample served as well for hematology and chemistry tests.

Vital signs including supine blood pressure, heart rate, respiration rate, and temperature were checked and a 12-lead electrocardiogram was obtained. Each of these parameters was evaluated at the time of screening, before injection, and at different times after injection of ^{99m}Tc-Annexin V128 (Table 1 and 2).

Table 1: Safety parameters

	BASELINE (V0) Screening, informed consent, enrollment	**Time span after ^{99m}Tc-Annexin V128 administration**								
		Minutes						Hours		
		0	5	15	30	60	90	3h	6h	24h
Administration of ^{99m}Tc-Annexin V128		X								
Scintigraphy acquisition										
Whole body (dosimetry and biodistribution)					X	X		X	X	X
Planar images of chest						X		X[2]		
SPECT						X		X[2]		
Safety parameters										
Pregnancy urinary test*	X									
Vital signs (heart rate, blood pressure, SaO_2)	X		X	X	X	X		X	X	X
Temperature	X									X
Physical examination	X									X
Blood samples	X[3,4,5]				X[4]		X[4]	X[4]	X[4]	X[4,5]
Urinary sample 24hours			→					→		
Adverse events			→					→		
Concomitant medication review			→					→		
Cardiac monitoring			→					→		
ECG (12 leads)	X			X				X	X	X

* women of childbearing potential
**all blood samples will be done in a different vein of the one used for radiotracer administration.
2 : additional acquisition depending of the result of the whole body scan
3 : include the antibody anti-Annexin assay
4 : dosimetry study (blood clearance of 99m Tc-Annexin V128
5: hematology and chemistry samples

Table 2: Safety parameters (continued)

	Visit V3 1 week ±3 days after administration of radiotracer	Visit V4 2 weeks ±3 days after administration of radiotracer	Visit V5 4 weeks ±3 days after administration of radiotracer
Blood Sample		X[3,5]	X[3,5]
Vital signs (heart rate, blood pressure, SaO_2)	X	X	X
Physical examination	X	X	X
Adverse events	→	→	→
Concomitant medication review	→	→	→
ECG (12 leads)	X	X	X
Collection of any measure useful for diagnosis or therapy	X	X	X

2.8 Immunogenicity

ELISA has been used to identify anti-annexin antibodies on blood samples taken before, 2 and 4 weeks after ^{99m}Tc-Anx128 administration. The sensitivity of the assay was 318 ng/mL, within the range recommended by the FDA guidance (Guidance for Industry - Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins, 2009), that is 250-500 ng/mL.

2.9 Statistical analysis

Continuous variables were presented as mean ± standard deviation (SD) and compared by use of Student's t-test. Categorical variables were presented as percentages and compared by use of Fisher's exact test. Pearson's correlation coefficients were calculated for the evaluation of significant association between two parameters. Statistical analysis was performed using MedCalc Statistical Software version 17.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2017). A p value ≤0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Study population

Eleven patients were included in the study. One of them withdrew his consent before administration of ^{99m}Tc-Anx128. The main baseline characteristics of the study population are summarized in Table 3. Patients were all males, aged 61.7 y (range: 51-79 y). The average injected activity of ^{99m}Tc-Annexin A5-128 was 339 MBq. The overall radiochemical purity was >98% (except a 92.4% for one patient).

Table 3: Characteristics of the study population (n=10)

Age, median [range]	61.7 years [min-max: 51-79]
Sex	10 males
History of valve surgery (n=7)	
CABG and TAVI	1
TAVI	1
Bioprothesis Aortic valve	1
Mechanical Aortic valve	1
Bioprothetic aortic valve	1
Bentall procedure	1
Mitral & aortic mechanical valves	1
Bacteriological analysis	
Streptococcus gallolyticus	3
HACEK	1
Streptococcus mitis	1
Streptococcus gordonii	1
E Coli	1
No germ found	3

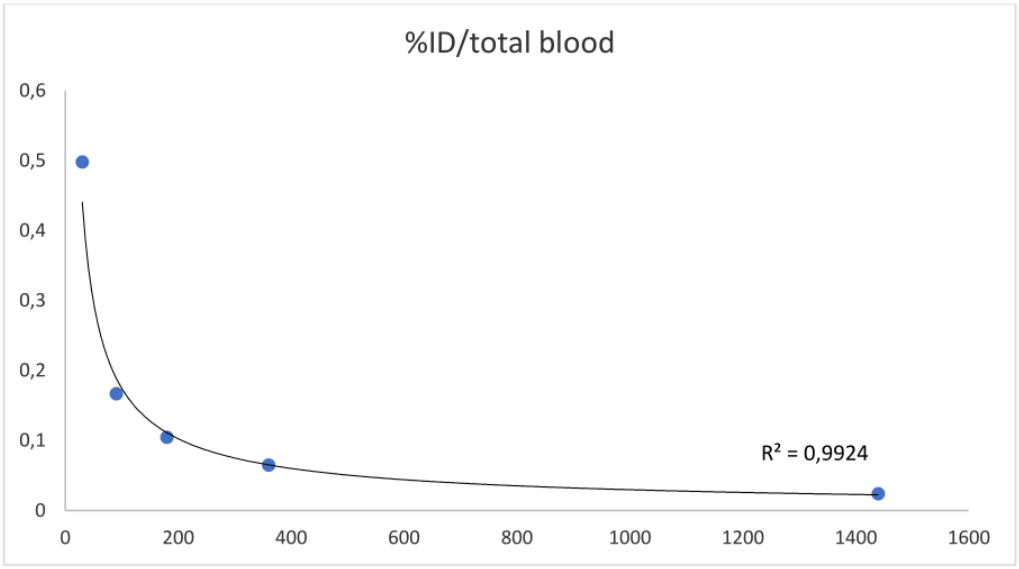
CABG: Coronary Artery Bypass Graft; TAVI: TransArterial Valve Implantation;

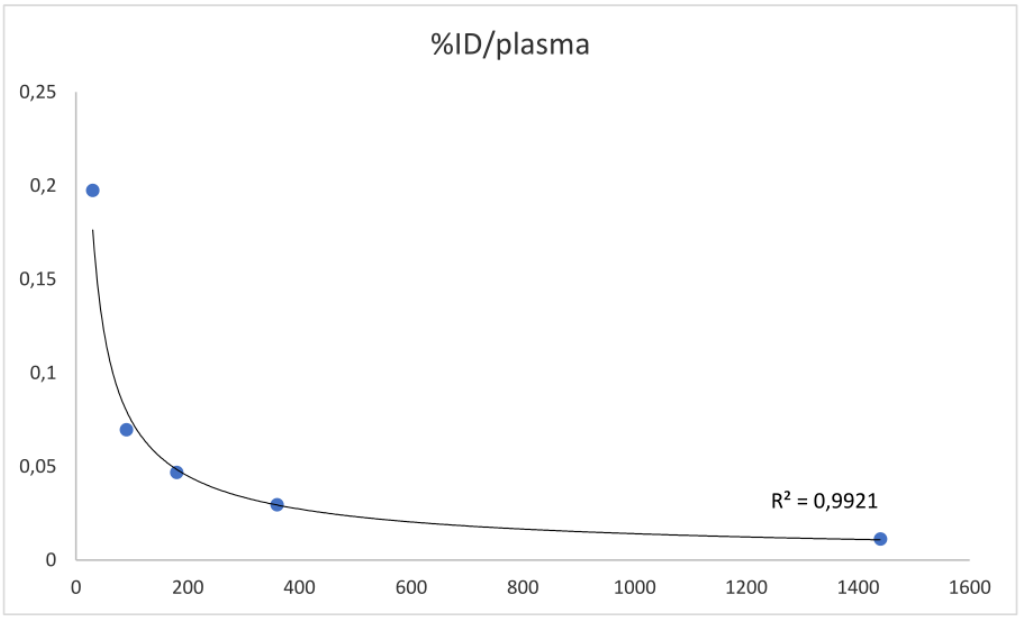
3.2 Biodistribution

Blood clearance

After intravenous injection, blood and plasma clearance of ^{99m}Tc-Annexin A5-128 followed a bi-exponential model (Blood: α = 22 min; β = 506 min and Plasma: α = 20 min; β = 502 min) (Figure 2). At 30 minutes after injection, less than 0.5% of the injected dose remained in the blood pool and this amount decreased to 0.02% at 24 hours (Table 4).

Figure 2: Blood clearance of ^{99m}Tc-Anx 128 in whole blood (upper panel) and plasma (lower panel).





15

Table 4: Blood clearance of ^{99m}Tc-Anx 128

	Whole blood		Plasma	
Time (min)	**%ID**	**%ID/g**	**%ID**	**%ID/g**
30	0.4984±0.2686	0.0091±0.0046	0.1975±0.1338	0.0107±0.0065
60	0.1669±0.0825	0.0030±0.0013	0.0697±0.0412	0.0038±0.0020
180	0.1049±0.0495	0.0019±0.0007	0.0469±0.0256	0.0027±0.0012
360	0.0652±0.0326	0.0012±0.0004	0.0297±0.0154	0.0017±0.0007
1440	0.0240±0.0125	0.0004±0.0002	0.0114±0.0065	0.0006±0.0003

Biodistribution

Biodistribution is presented Table 5 and Figure 3. There was a rapid uptake by the kidneys followed by increasing bladder activity, accounting for the renal clearance of Annexin. The uptake in the liver and the spleen did not change over time. Uptake in intestines was present from 6h post injection in all patients. Uptake in bone marrow was also visible, particularly in the spine and pelvis. Uptake in the lungs was only slightly above the background in the remaining soft tissue.

A representative example of biodistribution is illustrated Figure 4 (whole body scans of all patients are available in the Annex), showing high uptake of the tracer in the kidneys, the liver and the spleen. Significant activity was also present in urines. In 2 patients (01, 02), the gall bladder could also be distinguished from the liver by higher uptake from 3h post injection. One patient presented significant bilateral lung uptake, which was probably due to pulmonary sarcoidosis.

Table 5: Mean injected fraction value / per organ and per time

	Time (min)									
Organ	**30**		**60**		**180**		**360**		**1440**	
	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ
Whole Body	9.4E-01	1.7E-16	8.7E-01	3.4E-02	6.0E-01	8.1E-02	3.5E-01	4.7E-02	2.9E-02	2.2E-03
Liver	1.2E-01	3.0E-02	8.8E-02	2.3E-02	4.9E-02	1.8E-02	2.8E-02	6.7E-03	2.5E-03	4.1E-04
Spleen	2.5E-02	1.6E-02	1.9E-02	1.3E-02	1.1E-02	6.5E-03	7.8E-03	7.3E-03	5.3E-04	2.9E-04
Red Marrow	2.7E-02	8.1E-03	2.4E-02	7.7E-03	1.5E-02	7.4E-03	8.6E-03	4.2E-03	8.9E-04	3.7E-04
Kidneys	1.8E-01	6.5E-02	1.7E-01	7.3E-02	1.2E-01	5.0E-02	8.8E-02	4.2E-02	7.2E-03	5.5E-03
Thyroid	2.2E-03	2.0E-03	1.9E-03	1.8E-03	1.0E-03	9.2E-04	8.1E-04	8.1E-04	5.9E-05	6.2E-05
Testes	3.2E-03	1.0E-03	2.4E-03	1.2E-03	1.8E-03	7.8E-04	1.3E-03	7.9E-04	8.6E-05	5.9E-05

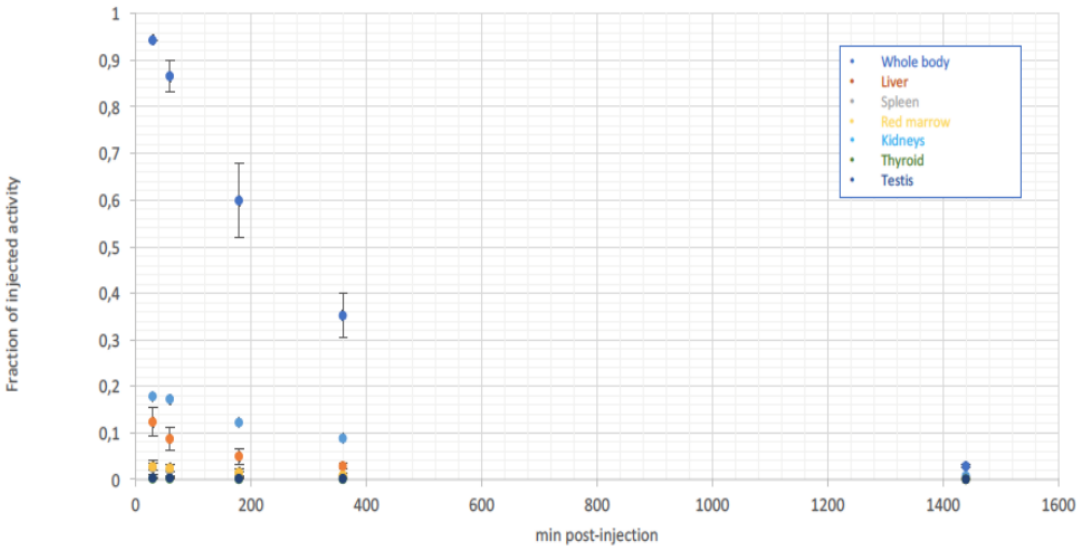


Figure 3: average uptake and standard deviation as a function of time for selected organs with high uptake and for the total body determined on iterative whole-body planar acquisitions

The uptake in the liver, the spleen and bone marrow remained stable over time.

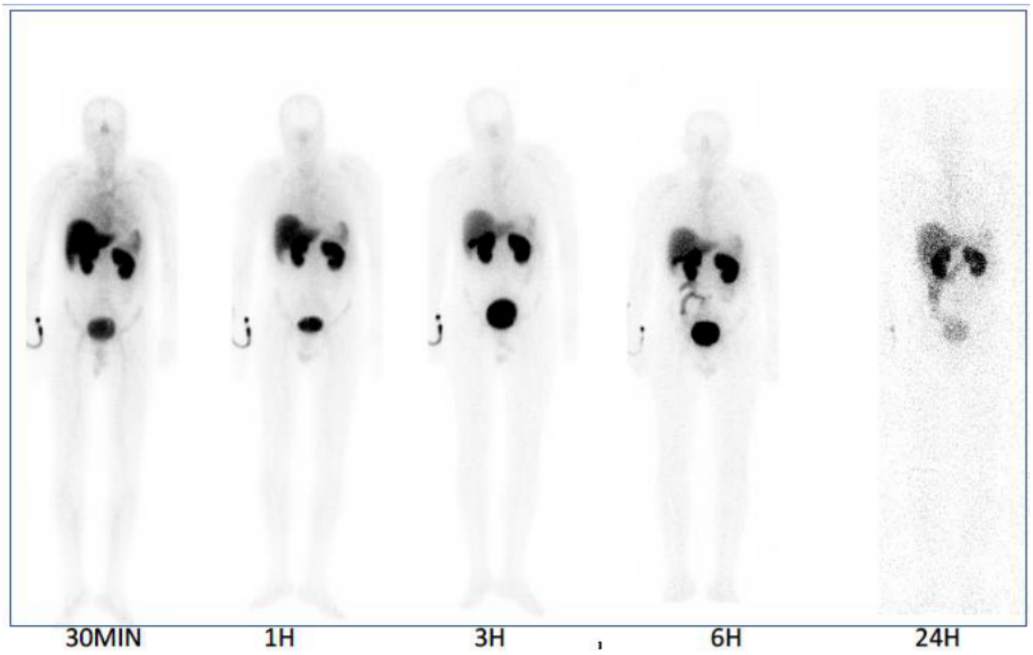


Figure 4: Consecutive anterior whole body 99mTc-Annexin V128 scintigraphy performed 30min, 1h, 3h, 6h and 24h post tracer injection. Of note high uptake on liver, renal and spleen. Gall bladder uptake is present from 3h after injection and the intestinal uptake from 6h. No significant uptake is present in lungs, myocardium or thyroid area. Low tracer uptake is noted on the oral cavity.

Relationship between blood clearance of 99mTc-Annexin and biological parameters

No significant relationship was present between biological parameter of inflammation and 99mTc-Anx128 blood pool activity (Table 6). The only correlation was found with blood creatinine.

Table 6: Correlations between ^{99m}Tc-Anx 128 blood-pool activity and selected biological parameters.

Biological parameter	R	P value
Creatinine	0.66	0.04
CRP	-0.26	0.5
Leucocytes	-0.15	0.7
Platelets	-0.09	0.8

3.3 Dosimetry

Results are presented Table 7. The total effective dose was estimated at 5.1 ± 0.3 µSv/MBq (1.9 mSv for an injected activity of 370 MBq). Organs receiving the highest absorbed dose were kidneys 76 µGy/MBq (28 mGy /370 MBq).

Table 7: Absorbed dose (D) per organ mGy/MBq / effective dose (E) mSv/MBq with type e error estimate.

Organ	D (mGy/MBq)	e
Liver	1.1E-02	1.1E-03
Spleen	2.2E-02	4.8E-03
Red marrow	4.1E-03	1.6E-04
Adrenals	1.7E-02	8.5E-04
Kidneys	7.6E-02	6.0E-04
Thyroid	1.0E-02	1.8E-03
Testes	7.7E-03	5.5E-05
E (mSv/MBq)	5.1E-03	3.4E-04

3.4 Safety

Vital signs, Physical findings and other observations

During the study, no clinically significant changes in vital signs from baseline values were identified after ^{99m}Tc-Annexin A5-128 administration (detailed Annex Table 10), except a drop of blood pressure in one patient 5 minutes after injection of the radiotracer (systolic blood pressure: from 140 mmHg to 80 mmHg and diastolic blood pressure: from 90 mmHg to 70 mmHg) (Figure 5). No changes were identified on 12-lead ECG.

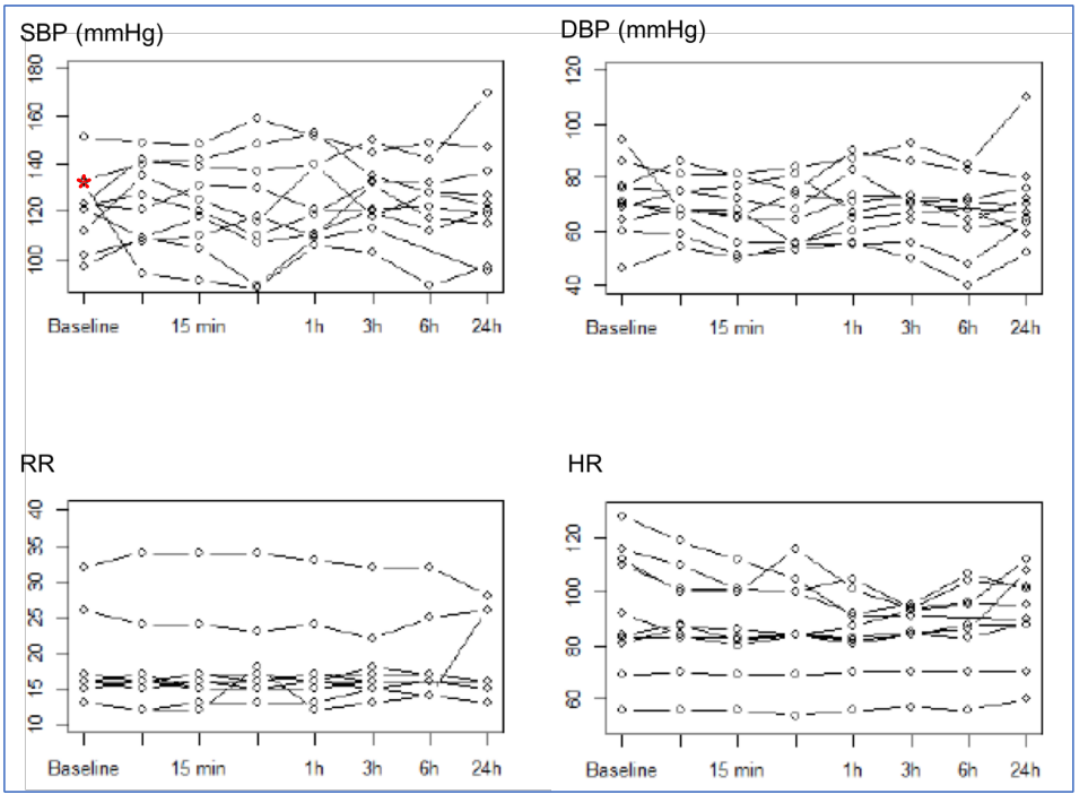


Figure 5: Follow up of vital signs from Baseline to the 24h post injection. No clinically significant changes in vital signs from baseline were noted. Of note a significant drop of the blood pressure in one patient without rising later (*). SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure, RR respiratory rate, HR heart rate.

Blood samplings

There were no clinically significant out-of-range values or significant changes in mean or median values identified with all assessments (hematology, biochemistry, urinalysis) (Detailed in Annex Table 11).

Adverse events (AEs) / Serious adverse events (SAEs)

The complete list of AEs and SAEs is presented in the Annex Table 12. During the trial 36 adverse events were reported in 9 patients. For one of them, the imputability could not be excluded. It was a generalized urticaria which appeared 3 days and 10 hours after administration of the radiotracer and regressed after oral antihistaminic treatment.

Four serious adverse events were reported in 3 patients, all related to the course of the disease according to the DSMB.

Four SAEs occurred in 3 patients. They were related to the natural progression of infective endocarditis and the imputability to 99mTc-Anx 128 has been excluded for all of them. There were 3 deaths, two of them 50 days after tracer administration, and 1 seven days after scintigraphy during surgery (detailed in Annex Table 12).

Summary of the immunogenicity assessment (RTC Study L0001)

A validated ELISA assay was applied to evaluate reactivity of patient serum samples. The method was developed such that there is a trend toward false positives rather than false negatives and a 5% of false positive response is expected. Two different operators were involved in clinical sample analysis. Both operators were previously involved in the method validation and a different normalization factor was established: Analyst B = 0.0059; Analyst A = 0.0079.

Ten patients were screened. For nine patients blood sample was collected at 3 time points (Baseline, 1 month, 3 months). For one patient (010) only baseline sample was available. The Normalization Factor was added to the average OD reading of the "Matrix" (diluted serum from healthy donors) in order to establish a threshold over which samples were considered reactive (potentially positive).

In the first analytical session the threshold was calculated to be 0.063 OD. One baseline sample resulted over the threshold (Patient 02, OD = 0.077). This result was considered to be false positive. Furthermore, at later time points the same patient showed no reactive response.

In the second analytical session the threshold was calculated to be 0.072 OD. Samples from Patient 011 showed reactive results at all time points with an average OD very close to threshold (Ab1 = 0.076; Ab2 = 0.073; Ab3 = 0.075) and amply below the low quality control (225 ng of specific antibody/mL of neat serum, OD= 0.093). The OD value was very similar at all time points with no clear induction of specific ADA response. This result maybe also considered to be false positive.

3.5 Detection of vegetations in infective endocarditis

Out of 6 patients with a final diagnosis of definite IE, ^{99m}Tc-Anx128 scintigraphy was positive in the cardiac area in 5. Focal uptake was present on a prosthetic aortic valve in 2 cases (Figure 6), on native valve in two cases, on pacemaker lead in one case. There was one false negative

scan, potentially related to two reasons: 1/ ^{99m}Tc-Annexin A5-128 scintigraphy was performed 10 days after the beginning of antibiotic therapy and 2/ the small size of the vegetation measured by the trans esophageal ultrasound (6 mm) on the native aortic valve with aortic disease (type 1 bicuspid aortic valve). The mean TBR=6 (min: 4; max: 9).

^{99m}Tc-Anx128 scintigraphy was negative in 4 patients with a final diagnosis of rejected (n=2) or possible IE (n=2).

Extra-thoracic abnormal uptake was present on the posterior tibial artery in 1 patient, corresponding to a septic embole on angiography (Figure 7).

Seven patients underwent FDG PET/CT. Abnormal cardiac FDG uptake was present in 2 cases, the location of which matched with Annexin. One true positive scan patient infective endocarditis on a native valve was false negative with FDG and a TP with Annexin (Figure 8).

Table 8: summary of 99mTc-Anx SPECT diagnostic performance.

ID	Age	PHV and/or CIED	Annexin conclusion	Final diagnosis	Diagnostic value	FDG PET *(valve only)*
01-ZS	60	N	NEGATIVE	DEFINITE	**FN**	NEGATIVE
02-MC	50	N	POSITIVE	DEFINITE	**TP**	NA (done after surgery)
03-CP	*61*	*Y*	*Consent withdrawn*			
04-KD	56	Y	POSITIVE	DEFINITE	**TP**	POSITIVE
05-CJ	56	Y	NEGATIVE	POSSIBLE		NEGATIVE
06-MP	64	Y	POSITIVE	DEFINITE	**TP**	
07-PM	55	N	POSITIVE	DEFINITE	**TP**	NEGATIVE
08-HM	78	Y	NEGATIVE	REJECTED	**TN**	NEGATIVE
09-DR	70	N	NEGATIVE	POSSIBLE		NEGATIVE
10-SM	71	Y	POSITIVE	DEFINITE	**TP**	POSITIVE
11-EM	62	Y	NEGATIVE	REJECTED	**TN**	

TP: true positive; TN: true negative; FN: false negative; ND: not done (consent withdrawal)

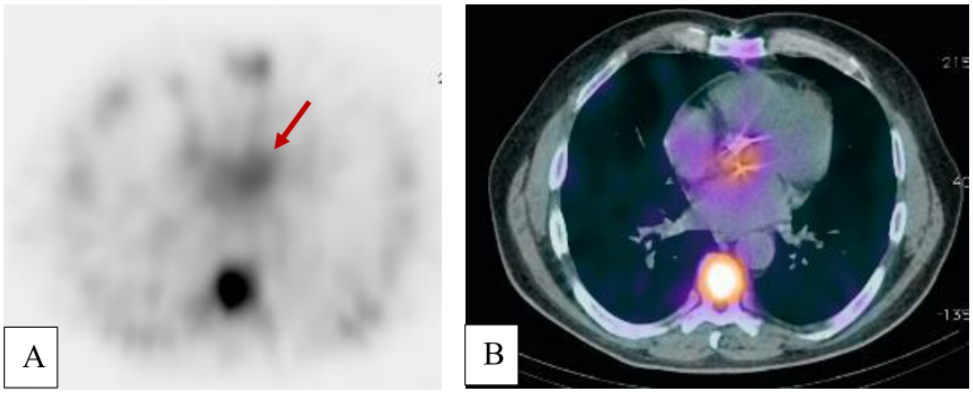


Figure 6: (A) axial 99mTc-rh-Annexin A5-128 and fused SPECT/CT (B) showing significant uptake on the aortic prosthetic valve (red arrow).

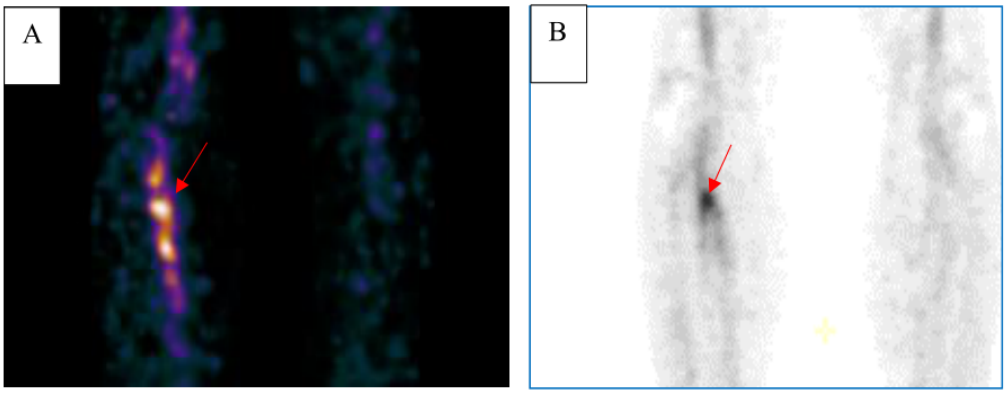


Figure 7: (A) Coronal slices of 99mTc-Annexin A5-128 and (B) 18FDG PET images showing significant uptake on the posterior tibial artery. Of note the uptake pattern varies according to the tracer: linear uptake along the thrombus with Annexin and focal uptake at the upper blood/thrombus interface with FDG.

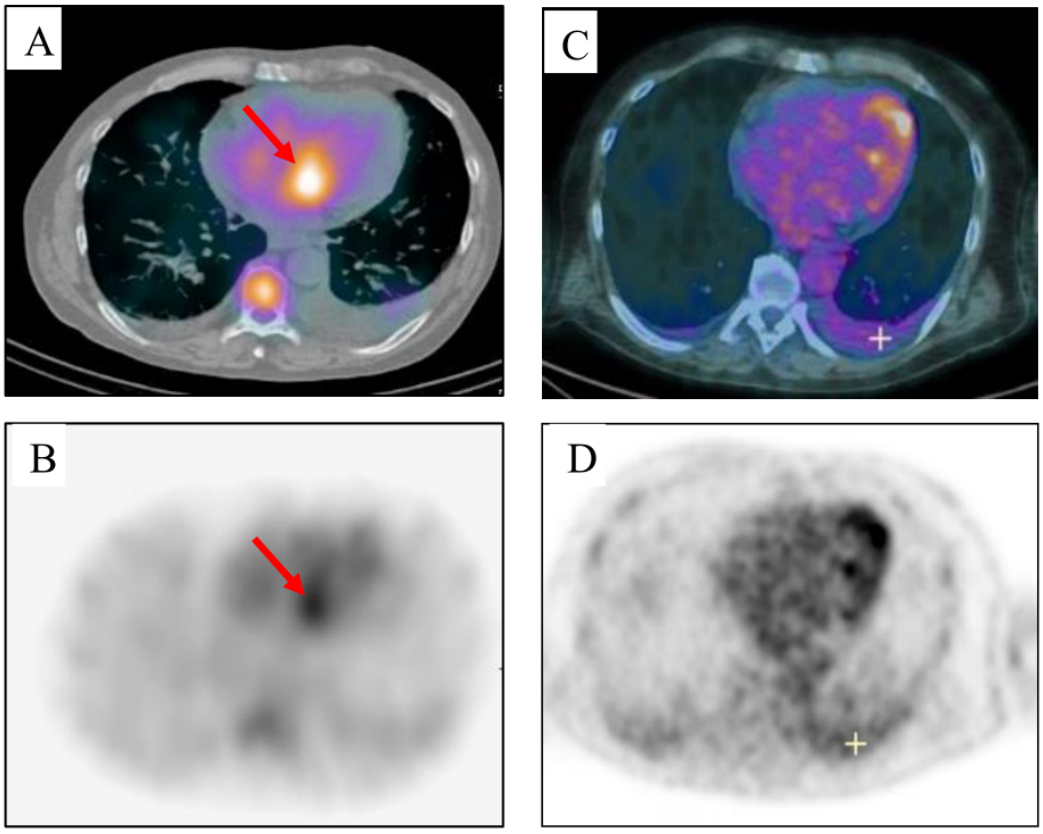


Figure 8: (A) Axial view of fused 99mTc-rh-Annexin V128 SPECT/CT and (B) axial view of 99mTc-rh-Annexin V128 shows an intense focal uptake (TBR=9) on native mitral valve, whereas no FDG uptake is present on the corresponding PET/CT axial slice (C and D).

4 Conclusion

The preliminary results of this phase I/II study showed that ^{99m}Tc-Anx128 is well tolerated. No significant adverse reaction related to the study drug occurred. There were no clinically significant out-of-range values or significant changes in biological parameters. Preliminary results are promising regarding the detection of IE.

5 Bibliography

1. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, Wilson W, Steckelberg J, Karchmer AW, et al. Diagnosis and Management of Infective Endocarditis and Its Complications. Circulation 1998;98:2936–2948. doi:10.1161/01.CIR.98.25.2936.
2. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. Lancet 2004;363:139–149. doi:10.1016/S0140-6736(03)15266-X.
3. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009)The Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2009;30:2369–2413. doi:10.1093/eurheartj/ehp285.
4. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. Nat Rev Dis Primer 2016;2:16059. doi:10.1038/nrdp.2016.59.
5. Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with 99mTc-annexin V. J Nucl Med 2005;46:807–815.
6. Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel J-B, Le Guludec D. Molecular imaging of platelet activation in thrombus. J Nucl Cardiol 2009;16:277–286. doi:10.1007/s12350-009-9053-5.
7. Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, Ceyssens S, Mortelmans L, Verbruggen AM, et al. Safety, biodistribution, and dosimetry of 99mTc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. J Nucl Med 2003;44:947–952.
8. Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kopiwoda S, Tait JF, et al. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. Eur J Nucl Med 1999;26:1251–1258.
9. Sarda-Mantel L. 99mTc-Annexin-V Functional Imaging of Luminal Thrombus Activity in Abdominal Aortic Aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:2153–2159. doi:10.1161/01.ATV.0000237605.25666.13.
10. Rouzet F, Hernandez MD, Hervatin F, Sarda-Mantel L, Lefort A, Duval X, et al. Technetium 99m–Labeled Annexin V Scintigraphy of Platelet Activation in Vegetations of Experimental Endocarditis. Circulation 2008;117:781–789. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.718114.
11. Widmer E, Que Y-A, Entenza JM, Moreillon P. New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. Curr Infect Dis Rep 2006;8:271–279. doi:10.1007/s11908-006-0071-z.
12. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, Gurusiddappa S, Kim JH, Pilka ES, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. Nature 2003;423:177–181. doi:10.1038/nature01589.
13. Que Y-A, Haefliger J-A, Piroth L, François P, Widmer E, Entenza JM, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis. J Exp Med 2005;201:1627–1635. doi:10.1084/jem.20050125.
14. Benali K, Louedec L, Azzouna RB, Merceron O, Nassar P, Al Shoukr F, et al. Preclinical validation of 99mTc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with 99mTc-HYNIC-annexin A5. Mol Imaging 2014;13.
15. Siegel JA, Thomas SR, Stubbs JB, Stabin MG, Hays MT, Koral KF, et al. MIRD Pamphlet No. 16: Techniques for Quantitative Radiopharmaceutical Biodistribution Data Acquisition and Analysis for Use in Human Radiation Dose Estimates. J Nucl Med 1999;40:37S–61S.

16. Buijs WCAM, Siegel JA, Boerman OC, Corstens FHM. Absolute Organ Activity Estimated by Five Different Methods of Background Correction. J Nucl Med 1998;39:2167–2172.
17. Stabin MG, Sparks RB, Crowe E. OLINDA/EXM: The Second-Generation Personal Computer Software for Internal Dose Assessment in Nuclear Medicine. J Nucl Med 2005;46:1023–1027.
18. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. Ann ICRP 2002;32:5–265.

6 Annexes

Table 9: Relationship between 99mTc-Anx 128 blood pool activity and selected biological parameters

Blood pool activity (cps)	Platelets count (G/L)	WBC count (G/L)	CRP value (mg/L)	Creatinine (µmol/L)
1010	206000	9,26	37	63
954	342000	7,20	38	69
1411	366000	16,46	140	91
2693	309000	10,46	138	115
775	244000	10,18	88	77
2069	135000	9,73	43	70
1399	177000	5,27	102	76
3205	227000	6,62	3	119
1113	202000	9,86	243	110
1478	366000	12,25	100	72

Table 10: Safety - Clinical parameters

	Baseline	5 min	15 min	30 min	1h	3h	6h (N=9)	24h
SBP (mmHg)	123 [97-151]	124 [94-149]	122.5 [91-148]	117 [88-159]	120 [106-153]	126.5 [103-150]	128 [89-149]	122 [95-170)
DBP (mmHg)	70.5 [46-94]	68 [54-86]	67 [50-81]	66 [53-84]	69 [55-90]	70.5 [50-93]	68 [40-85]	68.5 [52-110]
Respiratory rate (resp/min)	16 [13-32]	16 [12-34]	16 [12-34]	16 [13-34]	16 [12-33]	16 [13-32]	16 [14-32]	16 [13-28]
Temperature (°C)	36.75 [35.4-38.3]							37 [36.5-38.5]
Saturation O_2 (%)	99 [95-100]	100 [95-100]	100 [95-100]	100 [96-100]	98.5 [95-100]	97 [94-100]	98 [96-100]	99 [86-100]
Heart rate (bpm)	88 [56-128]	87.5 [56-119]	84.5 [56-112]	84 [54-116]	85 [56-105]	88 [57-95]	88 [56-107]	92.5 [60-112]

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure

28

Table 11: Safety - Biological parameters

	Baseline (before 99mTc-Anx 128 injection)	24H after injection
Sodium (mmol/l)	137 [132-143]	137 [131-142]
Potassium (mmol/l)	3.95 [3.1-5.3]	3.95 [3.4-5.1]
BUN (mmol/l)	5.1 [3.6-9.7]	5.5 [4.4-7.8]
Creatinine (µmol/l)	74.5 [62-115]	85 [61-119]
AST (UI/l)	31 [16-138]	13.5 [13-70]
ALT (UI/l)	49 [14-157]	40.5 [13-138]
Gamma-GT (UI/l)	152.5 [50-918]	141.5 [54-837]
Alkaline Phosphatase (UI/l)	102 [67-405]	91.5 [69-377]
Total Bilirubine (N=9) (µmol/l)	8 [6-61]	10 [5-54]
Conjugated Bilirubine (µmol/l)	30.5 [26-35]	31 [28-34]
Leucocytes (10^9/l)	9.8 [5.3-16.5]	9.6 [6.1-16.3]
Hemoglobin (g/dl)	11.9 [7.4-14]	11.8 [7.3-13.1]
Platelets (10^9/l)	235.5 [135-366]	267.5 [152-477]
Prothrombine time (%)	73.5 [25-100]	79.5 [18-111]
APTT (sec)	1.2 [1.0-34.0]	1.3 [1.0-34.0]
INR	1.2 [1.0-3.1]	1.2 [0.9-4.1]

BUN: Blood urea nitrogen; AST: aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase; APTT: activated partial thromboplastin time; INR: international normalized ratio

Figure 9: Safety - Biological parameters (individual changes)

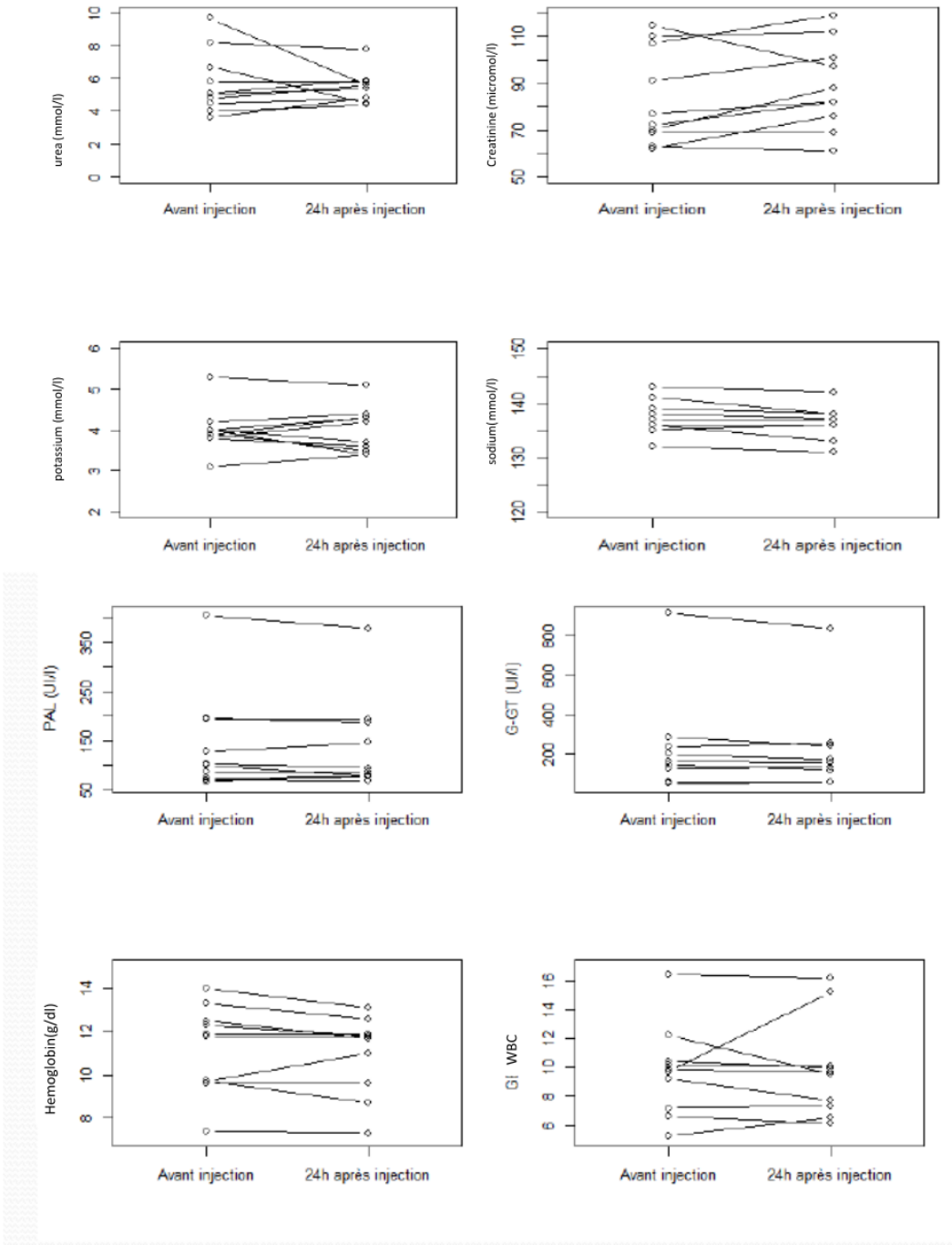


Table 12: Causes and imputability of Adverse Events

ID	Event description	Delay between ^{99m}TcAnx 128 administration and event	Imputability	SAE
02	Generalized urticaria Mitral valve replacement Diarrhea Dental extraction	3 days and 10 hours 10 days 14 days 18 days	**Not excluded** Excluded Excluded Excluded	
04	Ablation of the pacemaker	08 days	Excluded	
	Dry cough	04 days	Excluded	
	Dental extraction	32 days	Excluded	
05	Chills without fever	02 days	Excluded	
	Hemorrhagic diarrhea	02 days	Excluded	
	Cardiac Surgery, Mitral Valve Replacement	22 days	Excluded	
	Pericardial hematoma	26 days	Excluded	
	Left pleural effusion with atelectasis of the left lower lobe	26 days	Excluded	
	Ischemic stroke after surgery	26 days	Excluded	
	Pulmonary sepsis	28 days	Excluded	
	Haemorrhagic shock	28 days	Excluded	Life threatening
	Septic shock	28 days	Excluded	
		56 days	Excluded	Death

06	tibial arterial occlusion		Excluded	
	Disorientation episode with mild aphasia	3 hours	Excluded	
	Episode of Flutter	20 hours	Excluded	
	Ischemic brain injury	20 hours	Excluded	
	Aortic valve replacement surgery	1 day and 2 hours	Excluded	
	Pacemaker implantation	12 days	Excluded	
	Mycotic aneurysm of the tibial artery	14 days	Excluded	
	Dental extraction	21 days	Excluded	
	Dental extraction	26 days	Excluded	
07	Multiple Adenopathies Lymphoma		Excluded	
	Pulmonary acute edema	0	Excluded	
	2nd pulmonary acute edema	36 days	Excluded	
	Mitral insufficiency	36 days	Excluded	
	Renal failure	4 days	Excluded	
	Episode of confusion	4 days	Excluded	
	Occlusion of the left superficial femoral and left popliteal arteries	22 days	Excluded	
	Endocarditis progression	24 days	Excluded	
	Impaired consciousness	27 days	Excluded	
	Ischemic brain injury	26 days	Excluded	

		58 days	Excluded	Death
08	Cholestasis + hepatic cytolysis		Excluded	
	Right buttock pain (long-standing)	07 days	Excluded	
	Dental extraction	18 days	Excluded	
09	Dental extraction	29 days	Excluded	
10	Streptococcal endocarditis	1 day	Excluded	
	1st degree atrioventricular block	4 days	Excluded	
	Peri-prosthetic abscess	6 days	Excluded	
		7 days	Excluded	Death
11	hyperkaliemia	14 days	Excluded	
	Abdominal pain, diarrhea	14 days	Excluded	

33

4. CONCLUSION

En se basant sur les données précliniques concernant l'intérêt potentiel de l'AnxA5 radiomarquée dans les domaines cardiovasculaires, oncologiques et dans l'inflammation, l'industrie de radiotraceurs AAA a développé une production de kits d'un variant de l'annexine destinée au radio-marquage par le ^{99m}Tc (AnxA5-128) et répondant aux normes GMP.

Dans ce travail de thèse, nous avons effectué une validation pré clinique de cette forme GMP dans deux modèles animaux : un modèle d'apoptose cellulaire qui est le modèle de myocardite auto-immune, et un modèle d'activation plaquettaire qui est le modèle de l'endocardite infectieuse. La clairance sanguine initiale était plus rapide pour le ^{99m}Tc-AnxA5-128 comparé à celle de ^{99m}Tc-HYNIC-AnxA5, et la biodistribution tissulaire était globalement similaire pour les deux traceurs. La sensibilité diagnostique de l'Anx128 était excellente et comparable à celle de HYNIC-Anx.

Nous avons ensuite étayé les différentes étapes administratives qui ont abouti au démarrage de l'essai clinique AnnIE. Nous avons présenté le rapport concernant les premiers résultats de la première phase de tolérance sur 10 patients. La dosimétrie était comparable à celle décrite chez les volontaires sains. Aucun effet indésirable grave n'a été attribué à l'administration du radio traceur, et les premiers résultats de preuve de concept sont prometteurs.

Par ailleurs, dans le cadre du développement des traceurs d'imagerie TEP de la PS, nous avons travaillé sur un peptide à forte affinité à la PS, et ce grâce à une collaboration avec le laboratoire GUERBET. Malgré l'optimisation du radiomarquage, le contraste obtenu *in vivo* sur un modèle d'endocardite infectieuse était insuffisant. Malheureusement de nouvelles expérimentations sur ce peptide n'ont pas pu être menées en raison de l'arrêt de fabrication du peptide par le laboratoire.

PERSPECTIVES

1. SUITE DE L'ETUDE AnnIE

La deuxième partie de l'étude AnnIE va se poursuivre après la validation et l'avis favorable du comité de surveillance indépendant (DSMB : Data Safety Monitoring Board) de la première phase de l'étude portant sur l'évaluation de la tolérance du radiotraceur.

Elle prévoit une inclusion totale de 90 patients avec une suspicion d'EI et 30 patients avec un thrombus atrial. Elle aura pour objectifs : 1) l'évaluation de la sensibilité de l'AnxA5-128 dans la détection des ILT, comparativement à l'imagerie de référence dans chacune des deux pathologies prise séparément, 2) l'évaluation de la spécificité du radiotraceur dans la détection des végétations endocarditiques en comparaison avec l'échographie trans-oesophagienne, 3) l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du radiotraceur AnxA5-128 dans la détection des emboles périphériques symptomatiques ou asymptomatiques secondaires à la fragmentation des ILT, comparativement à l'angiographie IRM cérébrale et/ou le scanner abdomino-pelvien (ou thoracique) avec injection de produit de contraste, dans les 2 situations cliniques (EI et TA).

2. APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR L'AnxA5-128 dans LES DISSECTIONS AORTIQUES : PHRC PAIDDA

2.1 CONTEXTE CLINIQUE

Après la phase précoce, le pronostic des patients avec dissection de l'aorte descendante (type B) dépend de la dilatation de l'aorte disséquée puisque le risque de rupture est proportionnel au diamètre de l'aorte. La prévention de la rupture nécessite une chirurgie à haut risque. L'identification des patients à risque de progression dans la phase chronique de la dissection de type B est donc critique (*157*, *158*).

Dans ce contexte, les données cliniques suggèrent une relation entre la dilatation de l'aorte et la présence d'un thrombus dans la fausse lumière de la dissection (*160,161*). Comparativement à une dissection sans thrombus dans la fausse lumière, le risque est diminué lorsque le thrombus est totalement occlusif alors que le risque est augmenté lorsque le thrombus n'est que partiellement occlusif.

Notre groupe de recherche a montré que le thrombus mural artériel joue un rôle majeur dans diverses maladies cardiovasculaires humaines, telles que les anévrismes de l'aorte abdominale, l'athérothrombose dans les maladies coronariennes et les accidents vasculaires

cérébraux, les végétations d'endocardite infectieuse ou les embolies artérielles thrombotiques atriales (70, 137). La progression de la maladie et le risque de complications semblent en grande partie liés à l'activité biologique du thrombus. Cette activité est principalement pro-coagulante à l'interface avec le sang circulant, et protéolytique à l'interface entre le thrombus et la paroi artérielle. L'activation et l'agrégation des plaquettes au niveau de la couche luminale sont donc la caractéristique du renouvellement du thrombus mural. L'activité procoagulante peut être facilement mise en évidence in vivo par l'Annexine A5 radiomarquée (^{99m}Tc-Anx) qui se lie aux phosphatidylsérines exposées par les plaquettes activées. Les études précliniques indiquent que ^{99m}Tc-Anx est capable de détecter le thrombus artériel riche en plaquettes et d'évaluer l'activité de renouvellement du thrombus mural chronique (*103*, *104*), comme détaillé précédemment dans l'ensemble de la thèse.

2.2 ETUDE PAIDDA :

Donc l'étude PAIDDA, rentrant dans le cadre d'un PHRC (programme hospitalier de recherche clinique) a pour objectif principal d'établir une preuve de concept chez l'homme de la relation entre l'intensité de fixation du ^{99m}Tc-AnxA5-128 par le thrombus dans le faux chenal et la progression du diamètre aortique chez les patients ayant une dissection aortique de type B. C'est une étude de cohorte prospective. Le recrutement des patients sera effectué par le Centre de référence français pour les maladies de Marfan et apparentées, dirigé par le Pr. Jondeau et situé à l'hôpital de Bichat, en coordination avec les départements de cardiologie et de chirurgie cardiovasculaire. Le centre d'investigation clinique et le département de médecine nucléaire seront également impliqués dans le projet.

3. APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR L'AnxA5-128 A L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL D'ORIGINE INDETERMINEE (IVASC)

3.1 CONTEXTE CLINIQUE

Les AVC représentent la troisième cause de décès, la première cause de handicap et la deuxième cause de démence en Europe. Les plaques d'athérosclérose carotides sont la cause des AVC ischémiques chez environ 15 à 20 % des patients. En présence d'une sténose de l'artère carotide > 50 %, le risque d'AVC ischémique est évalué à environ 10% par an si les patients ont présenté des signes récents d'ischémie cérébrale mais à seulement 2% par an chez les patients asymptomatiques. Les bénéfices cliniques d'une endartérectomie carotidienne par voie chirurgicale ont été démontrés chez les patients

symptomatiques avec un haut degré de sténose carotide mais restent discutés chez les patients asymptomatiques et sont à mettre en balance avec les risques propres de l'intervention chirurgicale. Le développement d'outils permettant de mieux stratifier le risque d'AVC ischémique associé aux sténoses carotides serait d'un apport majeur pour améliorer la prise en charge de ces patients.

De nombreuses cellules apoptotiques sont détectées dans les plaques d'athérosclérose rompues. En particulier, les macrophages apoptotiques libèrent d'importantes quantités de facteur tissulaire dans la plaque, ce qui activent la formation locale d'un thrombus en cas de rupture de la plaque.

Dans une étude de preuve de concept, une captation élevée d'^{99m}Tc-AnxA5 a pu être mise en évidence en scintigraphie dans les plaques d'athérosclérose carotides de 4 patients qui avaient présenté un AVC ischémique récent. Cette captation était également associée à la présence de nombreuses cellules apoptotiques en histologie dans les plaques d'athérosclérose obtenues après endartérectomie chirurgicale.

3.2 ETUDE ANNICA : ÉVALUATION DE LA SCINTIGRAPHIE AVEC ^{99m}Tc- AnxA5-128 POUR L'IDENTIFICATION DES PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE COMPLIQUEES DANS LES ARTERES CAROTIDES

L'objectif primaire de cette étude sera d'évaluer la concordance entre la détection d'un signal dans les plaques carotides en scintigraphie après injection de ^{99m}Tc-AnxA5-128 et la présence de plaques d'athérosclérose compliquées sur les prélèvements obtenus après endartectomie carotidienne. Le critère d'évaluation principal est le calcul du coefficient de concordance Kappa de Cohen, avec un intervalle de confiance de 95% , entre la détection de la fixation du ^{99m}Tc-AnxA5-128 (variable binaire) mesurée sur la TEMP et la présence d'une plaque d'athérosclérose compliquée sur le prélèvement obtenue après endartectomie carotidienne.

Les objectifs secondaires de l'étude seront :

- d'évaluer le lien entre l'intensité du signal mesuré en scintigraphie avec ^{99m}Tc-AnxA5-128 et l'expression d'Annexine mesurée en histologie dans les plaques d'athérosclérose.
- d'évaluer le lien entre l'intensité du signal mesuré en scintigraphie avec ^{99m}Tc-AnxA5-128 et les caractéristiques des plaques en histologie (thrombus, hémorragie intra-plaque, rupture de plaque).

- d'évaluer les performances diagnostiques de la scintigraphie avec injection de ^{99m}Tc-AnxA5-128 pour la détection des plaques carotides compliquées.
- comparer l'intensité du signal de ^{99m}Tc-AnxA5-128 dans les plaques d'athéroscléroses carotides homo- vs. controlatérale à l'AVC ischémique.
- de tester la reproductibilité intra- et inter-opérateur de l'analyse des scintigraphies des plaques carotides avec ^{99m}Tc-AnxA5-128.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Gambhir SS. Just what is molecular imaging. *MI Gatew MICoE Newsl*. 2007;1:1–8.
2. Sinusas AJ, Bengel F, Nahrendorf M, et al. Multimodality Cardiovascular Molecular Imaging, Part I. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008;1:244-256.
3. James ML, Gambhir SS. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol Rev*. 2012;92:897-965.
4. Blake P, Johnson B, VanMeter JW. Positron Emission Tomography (PET) and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT): Clinical Applications. *J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc*. 2003;23:34-41.
5. Gaa J, Rummeny EJ, Seemann MD. Whole-body imaging with PET/MRI. *Eur J Med Res*. 2004;9:309-312.
6. van den Hoff J. Principles of quantitative positron emission tomography. *Amino Acids*. 2005;29:341-353.
7. Chang K, Jaffer F. Advances in fluorescence imaging of the cardiovascular system. *J Nucl Cardiol*. 2008;15:417-428.
8. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008;452:580-589.
9. Wu JC, Tseng JR, Gambhir SS. Molecular imaging of cardiovascular gene products. *J Nucl Cardiol Off Publ Am Soc Nucl Cardiol*. 2004;11:491-505.
10. Low AF, Tearney GJ, Bouma BE, Jang I-K. Technology Insight: optical coherence tomography—current status and future development. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:154-162.
11. Xu C, Ye J, Marks DL, Boppart SA. Near-infrared dyes as contrast-enhancing agents for spectroscopic optical coherence tomography. *Opt Lett*. 2004;29:1647-1649.
12. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ Res*. 2005;96:327-336.
13. Sun C, Veiseh O, Gunn J, et al. In Vivo MRI Detection of Gliomas by Chlorotoxin-Conjugated Superparamagnetic Nanoprobes. *Small Weinh Bergstr Ger*. 2008;4:372-379.
14. Sipkins DA, Cheresh DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KCP. Detection of tumor angiogenesis in vivo by αvβ3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med*. 1998;4:623-626.
15. Morawski AM, Lanza GA, Wickline SA. Targeted contrast agents for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16:89-92.
16. Cellular and Molecular Imaging With Targeted Contrast Ultrasound. PubMed Journals. https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/16641795/.
17. Villanueva FS, Lu E, Bowry S, et al. Myocardial Ischemic Memory Imaging With Molecular Echocardiography. *Circulation*. 2007;115:345-352.
18. Weller GER, Lu E, Csikari MM, et al. Ultrasound Imaging of Acute Cardiac Transplant Rejection With Microbubbles Targeted to Intercellular Adhesion Molecule-1. *Circulation*. 2003;108:218-224.
19. Leong-Poi H, Christiansen J, Klibanov AL, Kaul S, Lindner JR. Noninvasive Assessment of Angiogenesis by Ultrasound and Microbubbles Targeted to αv-Integrins. *Circulation*. 2003;107:455-460.
20. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*. 2003;17:545-580.

21. Popovtzer R, Agrawal A, Kotov NA, et al. Targeted Gold Nanoparticles enable Molecular CT Imaging of Cancer. *Nano Lett*. 2008;8:4593-4596.
22. Hyafil F, Cornily J-C, Feig JE, et al. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med*. 2007;13:636-641.
23. Li J, Chaudhary A, Chmura SJ, et al. A novel functional CT contrast agent for molecular imaging of cancer. *Phys Med Biol*. 2010;55:4389-4397.
24. Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano*. 2010;4:3689-3696.
25. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood*. 1997;89:1121-1132.
26. CHAFFEY N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Ann Bot*. 2003;91:401.
27. Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys*. 2010;39:407-427.
28. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*. 1983;736:57-66.
29. Kerbiriou-Nabias D, Geldwerth-Feniger D. Exposition membranaire de la phosphatidylsérine et activité procoagulante des plaquettes. *Hématologie*. 2007;13:94-109.
30. Hankins HM, Baldridge RD, Xu P, Graham TR. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic Cph Den*. 2015;16:35-47.
31. Baig AA, Haining EJ, Geuss E, et al. TMEM16F-mediated platelet membrane phospholipid scrambling is critical for hemostasis and thrombosis but not thromboinflammation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016:ATVBAHA–116.
32. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:9265-9269.
33. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
34. Marcus AJ, Broekman MJ, Pinsky DJ. COX Inhibitors and Thromboregulation. *N Engl J Med*. 2002;347:1025-1026.
35. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med*. 2008;359:938-949.
36. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *Lancet Lond Engl*. 2004;363:139-149.
37. Widmer E, Que Y-A, Entenza JM, Moreillon P. New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*. 2006;8:271-279.
38. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost*. 2005;94:278-285.
39. Werdan K, Dietz S, Löffler B, et al. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:35-50.
40. Thuny F, Grisoli D, Collart F, Habib G, Raoult D. Management of infective endocarditis: challenges and perspectives. *The Lancet*. 2012;379:965-975.
41. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature*. 2003;423:177-181.
42. Yeaman MR. The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense. *Clin Infect Dis*. 1997;25:951-968.

43. Sullam PM, Bayer AS, Foss WM, Cheung AL. Diminished platelet binding in vitro by Staphylococcus aureus is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infect Immun*. 1996;64:4915-4921.
44. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.
45. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992;149:4029-4035.
46. Sugimura M, Donato R, Kakkar VV, Scully MF. Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumour cell surfaces. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. 1994;5:365-373.
47. Meers P, Mealy T. Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochemistry (Mosc)*. 1993;32:5411-5418.
48. Burg ED, Remillard CV, Yuan JX-J. K+ channels in apoptosis. *J Membr Biol*. 2006;209:3-20.
49. Smith C, Gibson DF, Tait JF. Transmembrane voltage regulates binding of annexin V and lactadherin to cells with exposed phosphatidylserine. *BMC Biochem*. 2009;10:5.
50. Burtea C, Laurent S, Lancelot E, et al. Peptidic Targeting of Phosphatidylserine for the MRI Detection of Apoptosis in Atherosclerotic Plaques. *Mol Pharm*. 2009;6:1903-1919.
51. Kim S, Bae SM, Seo J, et al. Advantages of the Phosphatidylserine-Recognizing Peptide PSP1 for Molecular Imaging of Tumor Apoptosis Compared with Annexin V. *PLoS ONE*. 2015;10.
52. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*. 2004;9:525-529.
53. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*. 2010;15:40-56.
54. Ruoslahti E. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 2012;24:3747-3756.
55. Vadevoo SMP, Gurung S, Khan F, et al. Peptide-based targeted therapeutics and apoptosis imaging probes for cancer therapy. *Arch Pharm Res*. 2019;42:150-158.
56. Xiong C, Brewer K, Song S, et al. Peptide-Based Imaging Agents Targeting Phosphatidylserine for the Detection of Apoptosis. *J Med Chem*. 2011;54:1825-1835.
57. Shi J, Pipe SW, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1167-1174.
58. Dasgupta SK, Guchhait P, Thiagarajan P. Lactadherin binding and phosphatidylserine expression on cell surface-comparison with annexin A5. *Transl Res*. 2006;148:19-25.
59. N. Waehrens L, Rasmussen J, Heegaard C, Falborg L. Preparation andin vitro evaluation of99mTc-labelled bovine lactadherin as a novel radioligand for apoptosis detection. *J Label Compd Radiopharm - J LABEL Compd RADIOPHARM*. 2007;50:211-217.
60. Hvarregaard J, Andersen MH, Berglund L, Rasmussen JT, Petersen TE. Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur J Biochem*. 1996;240:628-636.
61. Waehrens LN, Heegaard CW, Gilbert GE, Rasmussen JT. Bovine Lactadherin as a Calcium-independent Imaging Agent of Phosphatidylserine Expressed on the Surface of Apoptotic HeLa Cells. *J Histochem Cytochem*. 2009;57:907-914.

62. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 2002;417:182-187.
63. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2006;69:1193-1201.
64. Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA. Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol*. 1995;2:968-974.
65. Shi J. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood*. 2003;101:2628-2636.
66. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*. 1990;265:4923-4928.
67. Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: Effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298:187-191.
68. Poulsen RH, Rasmussen JT, Ejlersen JA, et al. Pharmacokinetics of the phosphatidylserine tracers 99m Tc-lactadherin and 99m Tc-annexin V in pigs. *EJNMMI Res*. 2013;3:15.
69. Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, et al. Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications*. *J Nucl Med*. 2005;46:2035-2050.
70. Bouter A, Gounou C, Bérat R, et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun*. 2011;2:270.
71. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 2002;82:331-371.
72. Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *Int J Mol Sci*. 2013;14:2652-2683.
73. Mirsaeidi M, Gidfar S, Vu A, Schraufnagel D. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J Transl Med*. 2016;14.
74. Huber R, Römisch J, Paques EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J*. 1990;9:3867-3874.
75. Geisow MJ, Walker JH. New proteins involved in cell regulation by Ca2+ and phospholipids. *Trends Biochem Sci*. 1986;11:420-423.
76. Hofmann A, Delmer DP, Wlodawer A. The crystal structure of annexin Gh1 from Gossypium hirsutum reveals an unusual S3 cluster. Implications for cellulose synthase complex formation and oxidative stress response. *Eur J Biochem*. 2003;270:2557-2564.
77. Gilmanshin R, Creutz CE, Tamm LK. Annexin IV reduces the rate of lateral lipid diffusion and changes the fluid phase structure of the lipid bilayer when it binds to negatively charged membranes in the presence of calcium. *Biochemistry (Mosc)*. 1994;33:8225-8232.
78. Reutelingsperger CPM. Annexins: Key Regulators of Haemostasis, Thrombosis, and Apoptosis. *Thromb Haemost*. 2001;86:413-9.
79. Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol*. 2004;5:219.
80. Maurer-Fogy I, Reutelingsperger CP, Pieters J, Bodo G, Stratowa C, Hauptmann R. Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca2+-dependent phospholipid-binding protein. *Eur J Biochem*. 1988;174:585-592.

81. Iwasaki A, Suda M, Nakao H, et al. Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein. *J Biochem (Tokyo)*. 1987;102:1261-1273.
82. Huber R, Berendes R, Burger A, et al. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement: Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol*. 1992;223:683-704.
83. Sopkova-De Oliveira Santos Jana, Vincent Michel, Tabaries Sébastien, et al. Annexin A5 D226K structure and dynamics: identification of a molecular switch for the large-scale conformational change of domain III. *FEBS Lett*. 2001;493:122-128.
84. Sopkova-De Oliveira Santos J, Fischer S, Guilbert C, Lewit-Bentley A, Smith JC. Pathway for large-scale conformational change in annexin V. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;39:14065-14074.
85. O Oling F, Santos JS, Govorukhina N, Mazères-Dubut C, Bergsma-Schutter W, Oostergetel G, Keegstra W, Lambert O, Lewit-Bentley A, Brisson A. Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study. J Mol Biol. 2000 Dec 8;304(4):561-73.
86. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-1420.
87. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6349-6354.
88. Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with 99mTc-annexin V. *J Nucl Med*. 2005;46:807–815.
89. Wang J, Liu J, Cao Y, Hu M, Hua Z. Domain IV of Annexin A5 Is Critical for Binding Calcium and Guarantees Its Maximum Binding to the Phosphatidylserine Membrane. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem*. 2017;22.
90. Coméra C, Rothhut B, Russo-Marie F. Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitory proteins in human mononuclear cells. *Eur J Biochem*. 1990;188:139-146.
91. Li X, Link JM, Stekhova S, et al. Site-Specific Labeling of Annexin V with F-18 for Apoptosis Imaging. *Bioconjug Chem*. 2008;19:1684-1688.
92. Bauwens M, De Saint-Hubert M, Devos E, et al. Site-specific 68Ga-labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis. *Nucl Med Biol*. 2011;38:381-392.
93. Blankenberg FG, Strauss HW. Non-invasive diagnosis of acute heart-or lung-transplant rejection using radiolabeled annexin V. *Pediatr Radiol*. 1999;29:299–305.
94. D'Arceuil H, Rhine W, Crespigny A de, et al. 99mTc Annexin V Imaging of Neonatal Hypoxic Brain Injury. *Stroke*. 2000;31:2692-2700.
95. Taki J, Higuchi T, Kawashima A, et al. Detection of cardiomyocyte death in a rat model of ischemia and reperfusion using 99mTc-labeled annexin V. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2004;45:1536-1541.
96. Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, et al. 99mTc-Hynic-annexin V imaging to evaluate inflammation and apoptosis in rats with autoimmune myocarditis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30:232-238.
97. Peker C, Sarda-Mantel L, Loiseau P, et al. Imaging apoptosis with (99m)Tc-annexin-V in experimental subacute myocarditis. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2004;45:1081-1086.
98. Lu Hong, Daugherty Alan. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:485-491.

99. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16:285-292.
100. Kockx MM. Pathological changes in the coronary arteries in the acute coronary syndromes. *Heart*. 2006;92:1557-1558.
101. Tabas I. Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2255-2264.
102. Korngold EC, Jaffer FA, Weissleder R, Sosnovik DE. Noninvasive imaging of apoptosis in cardiovascular disease. *Heart Fail Rev*. 2008;13:163-173.
103. Sarda-Mantel L. 99mTc-Annexin-V Functional Imaging of Luminal Thrombus Activity in Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2153-2159.
104. Rouzet F, Hernandez MD, Hervatin F, et al. Technetium 99m–Labeled Annexin V Scintigraphy of Platelet Activation in Vegetations of Experimental Endocarditis. *Circulation*. 2008;117:781-789.
105. Tait JF, Smith C, Levashova Z, Patel B, Blankenberg FG, Vanderheyden J-L. Improved detection of cell death in vivo with annexin V radiolabeled by site-specific methods. *J Nucl Med*. 2006;47:1546–1553.
106. Tait JF, Brown DS, Gibson DF, Blankenberg FG, Strauss HW. Development and Characterization of Annexin V Mutants with Endogenous Chelation Sites for ^{99m} Tc. *Bioconjug Chem*. 2000;11:918-925.
107. Luo Q, Zhang Z, Wang F, Lu H, Guo Y, Zhu R. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of 99mTc-Annexin B1: A novel radioligand for apoptosis imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:1102-1106.
108. Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, et al. Increased Uptake of the Apoptosis-imaging Agent 99mTc Recombinant Human Annexin V in Human Tumors after One Course of Chemotherapy as a Predictor of Tumor Response and Patient Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2766-2774.
109. Blankenberg F. To Scan or Not To Scan, It Is a Question of Timing: Technetium-99m-Annexin V Radionuclide Imaging Assessment of Treatment Efficacy after One Course of Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2757-2758.
110. Boersma HH, Liem IH, Kemerink GJ, et al. Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for 99mTc-Annexin A5. *Br J Radiol*. 2003;76:553-560.
111. Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, et al. Safety, biodistribution, and dosimetry of 99mTc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med*. 2003;44:947–952.
112. Bronckers AL, Goei SW, Dumont E, et al. In situ detection of apoptosis in dental and periodontal tissues of the adult mouse using annexin-V-biotin. *Histochem Cell Biol*. 2000;113:293-301.
113. Bronckers AL, Goei W, van Heerde WL, Dumont EA, Reutelingsperger CP, van den Eijnde SM. Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labelling. *Cell Tissue Res*. 2000;301:267-272.
114. Larsen SK, Solomon HF, Caldwell G, Abrams MJ. [99mTc]tricine: a useful precursor complex for the radiolabeling of hydrazinonicotinate protein conjugates. *Bioconjug Chem*. 1995;6:635-638.
115. Morita I, Matsuno H, Sakai K, et al. Time course of apoptosis in collagen-induced arthritis. *Int J Tissue React*. 1998;20:37-43.

116. Zenmyo M, Komiya S, Kawabata R, Sasaguri Y, Inoue A, Morimatsu M. Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *J Pathol*. 1996;180:430-433.
117. Haas RLM, de Jong D, Valdés Olmos RA, et al. In vivo imaging of radiation-induced apoptosis in follicular lymphoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59:782-787.
118. Post AM, Katsikis PD, Tait JF, Geaghan SM, Strauss HW, Blankenberg FG. Imaging Cell Death with Radiolabeled Annexin V in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *J Nucl Med*. 2002;43:1359-1365.
119. Jin M, Smith C, Hsieh H-Y, Gibson DF, Tait JF. Essential Role of B-helix Calcium Binding Sites in Annexin V-Membrane Binding. *J Biol Chem*. 2004;279:40351-40357.
120. Ben Azzouna R, Guez A, Benali K, et al. Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, a functionalized phosphatidylserine-binding peptide. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2017;2.
121. Benali K, Louedec L, Azzouna RB, et al. Preclinical validation of 99mTc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with 99mTc-HYNIC-annexin A5. *Mol Imaging*. 2014;13.
122. Denèfle T, Boullet H, Herbi L, et al. Thrombospondin-1 Mimetic Agonist Peptides Induce Selective Death in Tumor Cells: Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies. *J Med Chem*. 2016;59:8412-8421.
123. Hofland LJ, Lamberts SWJ, Feelders RA. Role of Somatostatin Receptors in Normal and Tumoral Pituitary Corticotropic Cells. *Neuroendocrinology*. 2010;92:11-16.
124. Rubio DM, Schoenbaum EE, Lee LS, et al. Defining Translational Research: Implications for Training. *Acad Med J Assoc Am Med Coll*. 2010;85:470-475.
125. Byrne DW, Biaggioni I, Bernard GR, et al. Clinical and Translational Research Studios: A Multidisciplinary Internal Support Program. *Acad Med*. 2012;87:1052-1059.
126. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, et al. Diagnosis and Management of Infective Endocarditis and Its Complications. *Circulation*. 1998;98:2936-2948.
127. Habib G, Hoen B, Tornos P, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009)The Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2009;30:2369-2413.
128. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 2015;36:3075-3128.
129. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, et al. Preeminence of Staphylococcus aureus in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012;54:1230-1239.
130. Heiro M, Helenius H, Mäkilä S, et al. Infective endocarditis in a Finnish teaching hospital: a study on 326 episodes treated during 1980-2004. *Heart Br Card Soc*. 2006;92:1457-1462.
131. Cahill TJ, Baddour LM, Habib G, et al. Challenges in Infective Endocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:325-344.
132. Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. Staphylococcus aureus bacteraemia and endocarditis - epidemiology and outcome: a review. *Infect Dis Lond Engl*. 2018;50:175-192.

133. Federspiel JJ, Stearns SC, Peppercorn AF, Chu VH, Fowler VG. Endocarditis Trends in the United States Demonstrate Increasing Rates of Staphylococcus aureus: 1999–2008. *Arch Intern Med*. 2012;172:363-365.
134. Hoen B. Epidemiology and antibiotic treatment of infective endocarditis: an update. *Heart*. 2006;92:1694-1700.
135. Muñoz P, Kestler M, De Alarcon A, et al. Current Epidemiology and Outcome of Infective Endocarditis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94.
136. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, et al. Infective Endocarditis: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Statement for Healthcare Professionals From the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: Endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation*. 2005;111:e394-e434.
137. Rouzet F, de Labriolle-Vaylet C, Trouillet J-L, et al. Diagnostic value of 99mTc-HMPAO-labeled leukocytes scintigraphy in suspicion of post-sternotomy mediastinitis relapse. *J Nucl Cardiol*. 2015;22:123-129.
138. Rouzet F, Chequer R, Benali K, et al. Respective Performance of 18F-FDG PET and Radiolabeled Leukocyte Scintigraphy for the Diagnosis of Prosthetic Valve Endocarditis. *J Nucl Med*. 2014;55:1980-1985.
139. Rouzet F, Guludec DL. 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography in Cardiac Implantable Electronic Devices Infection: Ready for Routine Care! *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10:e006321.
140. Hyafil F, Rouzet F, Lepage L, et al. Role of radiolabelled leucocyte scintigraphy in patients with a suspicion of prosthetic valve endocarditis and inconclusive echocardiography. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging*. 2013;14:586-594.
141. Hyafil F, Rouzet F, Guludec DL. Nuclear imaging for patients with a suspicion of infective endocarditis: Be part of the team! *J Nucl Cardiol*. 2017;24:207-211.
142. Iung B, Rouzet F, Brochet E, Duval X. Cardiac Imaging of Infective Endocarditis, Echo and Beyond. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19:8.
143. Saby L, Laas O, Habib G, et al. Positron emission tomography/computed tomography for diagnosis of prosthetic valve endocarditis: increased valvular 18F-fluorodeoxyglucose uptake as a novel major criterion. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:2374-2382.
144. Riet JV, Hill EE, Gheysens O, et al. 18F-FDG PET/CT for early detection of embolism and metastatic infection in patients with infective endocarditis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:1189-1197.
145. Duval X, Iung B. Extracardiac Imaging of Infective Endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19:24.
146. Mikail N, Benali K, Ou P, et al. Detection of Mycotic Aneurysms of Lower Limbs by Whole-Body 18F-FDG-PET. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8:859-862.
147. Millar BC, Prendergast BD, Alavi A, Moore JE. Positron emission tomography (PET): a new tool in the diagnosis of endocarditis. *Heart Br Card Soc*. 2009;95:332-333.
148. Millar BC, Prendergast BD, Alavi A, Moore JE. 18FDG-positron emission tomography (PET) has a role to play in the diagnosis and therapy of infective endocarditis and cardiac device infection. *Int J Cardiol*. 2013;167:1724-1736.
149. Spence AM, Muzi M, Mankoff DA, et al. 18F-FDG PET of gliomas at delayed intervals: improved distinction between tumor and normal gray matter. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2004;45:1653-1659.

150. Cooper HA, Thompson EC, Laureno R, et al. Subclinical brain embolization in left-sided infective endocarditis: results from the evaluation by MRI of the brains of patients with left-sided intracardiac solid masses (EMBOLISM) pilot study. *Circulation*. 2009;120:585-591.
151. Iung B, Tubiana S, Klein I, et al. Determinants of cerebral lesions in endocarditis on systematic cerebral magnetic resonance imaging: a prospective study. *Stroke*. 2013;44:3056-3062.
152. Hess A, Klein I, Iung B, et al. Brain MRI findings in neurologically asymptomatic patients with infective endocarditis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:1579-1584.
153. Chakraborty T, Scharf E, Rabinstein AA, et al. Utility of Brain Magnetic Resonance Imaging in the Surgical Management of Infective Endocarditis. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. 2017;26:2527-2535.
154. Champey J, Pavese P, Bouvaist H, Kastler A, Krainik A, Francois P. Value of brain MRI in infective endocarditis: a narrative literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2016;35:159-168.
155. Blackshear JL, Kopecky SL, Litin SC, Safford RE, Hammill SC. Management of Atrial Fibrillation in Adults: Prevention of Thromboembolism and Symptomatic Treatment. *Mayo Clin Proc*. 1996;71:150-160.
156. Rozenberg VD, Nepomnyashchikh LM. Pathomorphological Criteria of Arrhythmogenic Heart. *Bull Exp Biol Med*. 2003;136:93-96.
157. Mimoun L, Detaint D, Hamroun D, et al. Dissection in Marfan syndrome: the importance of the descending aorta. *Eur Heart J*. 2011;32:443-449.
158. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2010;76:E43-86.
159. Tsai TT, Evangelista A, Nienaber CA, et al. Partial thrombosis of the false lumen in patients with acute type B aortic dissection. *N Engl J Med*. 2007;357:349-359.
160. Sakalihasan N, Nienaber CA, Hustinx R, et al. (Tissue PET) Vascular metabolic imaging and peripheral plasma biomarkers in the evolution of chronic aortic dissections. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging*. 2015;16:626-633.
161. Rouzet F, Sarda-Mantel L, Michel J-B, Guludec DL. Molecular imaging of platelet activation in thrombus. *J Nucl Cardiol*. 2009;16:277-286.

TRAVAUX ET PARTICIPATION AUX CONGRES DANS LE CADRE DE LA THEMATIQUE DE RECHERCHE

1. ARTICLES PUBLIES :

1 : Mikail N, **Benali K**, Mahida B, Vigne J, Hyafil F, Rouzet F, Le Guludec D.
(18)F-FDG-PET/CT Imaging to Diagnose Septic Emboli and Mycotic Aneurysms in Patients with Endocarditis and Cardiac Device Infections. Curr Cardiol Rep. 2018 Mar 6;20(3):14.

2: Hyafil F, Rouzet F, **Benali K**.
FDG-PET for the detection of infection in left ventricle assist device: Is there light at the end of the tunnel? J Nucl Cardiol.2018 Feb 1

3: Mikail N, **Benali K**, Dossier A, Bouleti C, Hyafil F, Le Guludec D, Rouzet F, OuP.
Additional Diagnostic Value of Combined Angio-Computed Tomography and(18)F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Infectious Aortitis. JACC Cardiovasc Imaging. 2018 Feb;11(2 Pt 2):361-364.

4: Mathieu C, Mikaïl N, **Benali K**, Iung B, Duval X, Nataf P, Jondeau G, Hyafil F, Le Guludec D, Rouzet F. Response by Mathieu et al to Letter Regarding Article,"Characterization of (18)F-Fluorodeoxyglucose Uptake Pattern in Noninfected Prosthetic Heart Valves". Circ Cardiovasc Imaging. 2017 Jul;10(7).

5: Mathieu C, Mikaïl N, **Benali K**, Iung B, Duval X, Nataf P, Jondeau G, Hyafil F, Le Guludec D, Rouzet F. Characterization of (18)F-Fluorodeoxyglucose UptakePattern in Noninfected Prosthetic Heart Valves. Circ Cardiovasc Imaging. 2017

6: Ben Azzouna R, Guez A, **Benali K**, Al-Shoukr F, Gonzalez W, Karoyan P, Rouzet F,Le Guludec D. Synthesis, gallium labelling and characterization of P04087, afunctionalized phosphatidylserine-binding peptide. EJNMMI Radiopharm Chem.2017;2(1):3.

7: Mikail N, **Benali K**, Ou P, Slama J, Hyafil F, Le Guludec D, Rouzet F.
Detectionof Mycotic Aneurysms of Lower Limbs by Whole-Body (18)F-FDG-PET. JACC Cardiovasc Imaging. 2015 Jul;8(7):859-62.

8: Rouzet F, Chequer R, **Benali K**, Lepage L, Ghodbane W, Duval X, Iung B, VahanianA, Le Guludec D, Hyafil F.
Respective performance of 18F-FDG PET and radiolabel ed leukocyte scintigraphy for the diagnosis of prosthetic valve endocarditis. J NuclMed. 2014 Dec;55(12):1980-5.

9: **Benali K,** Louedec L, Azzouna RB, Merceron O, Nassar P, Al Shoukr F, Petiet A, Barbato D, Michel JB, Sarda-Mantel L, Le Guludec D, Rouzet F.
Preclinical validation of 99mTc-annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with 99mTc-HYNIC-annexin A5. Mol Imaging. 2014;13.

10: Rouzet F, de Labriolle-Vaylet C, Trouillet JL, Hitzel A, **Benali K**, Lebtahi R,Le Guludec D.
Diagnostic value of ^{99}mTc-HMPAO-labeled leukocytes scintigraphy in suspicion of post-sternotomy mediastinitis relapse. J Nucl Cardiol. 2015Feb;22(1):123-9.

11: Hyafil F, Rouzet F, Lepage L, **Benali K**, Raffoul R, Duval X, Hvass U, Iung B, Nataf P, Lebtahi R, Vahanian A, Le Guludec D.
Role of radiolabelled leucocytescintigraphy in patients with a suspicion of prosthetic valve endocarditis andinconclusive echocardiography. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2013Jun;14(6):586-94.

2. PRINCIPALES PRESENTATIONS SCIENTIFIQUES :

2.1. COMMUNICATIONS ORALES :

Benali K,W. Ferrag, R. Ben Azzouna, C. Laouenan, A. Dieudonne, E. Illic-Habensus, I. Gorenne, D. Chicco, M. Mariani, B. Iung , X. Duval, D. Le Guludec, F. Rouzet
Phase I/II study of ^{99m}Tc-Annexin A5-128: safety, biodistribution, dosimetry and preliminary results in infective endocarditis.
EANM 2018 Congress in Düsseldorf/Germany

Benali K, Rouzet F, Ben Azzouna R, Petiet A, Louedec L, Milliner M, Sarda-Mantel L, , D Chicco, A Filannino, Michel JB, Le Guludec
Comparison between 99mTc-labeled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 for the *in vivo* diagnosis of experimental infective endocarditis:
ICNC 11, Nuclear Cardiology and Cardiac CT,May 2013 , Berlin - Germany

Benali K, Ben Azzouna R, Petiet A, Louedec L, Milliner M, Rouzet F, Barbato D, Bucci C, Michel J-B, Le Guludec D, Sarda-Mantel L.
Comparison between 99mTc-HYNIC-AnnexinA5 and 99mTc-AnnexinA5-128 for in vivo detection of experimental auto immune myocarditis ICNC 11, Nuclear Cardiology and Cardiac CT,May 2013 , Berlin - Germany
This research has been selected as finalist for the Young Investigator Award
Competition an the International Conference on Nuclear Cardiology and Cardiac
CT ICNC 05 May 2013 - 08 May 2013, Berlin – Germany

Benali K, Rouzet F, Ben Azzouna R, Petiet A, Louedec L, Milliner M, Sarda-Mantel L, , D Chicco, A Filannino, Michel JB, Le Guludec
Comparison between 99mTc-labelled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 in experimental infective endocarditis.EANM'12 - MILAN 2012

Hyafil F, Rouzet F**,** Sarda-Mantel L**, Benali K**, Slama J, Lebtahi R, Le Guludec D.
Role of radiolabeled leukocyte scintigraphy in patients with suspicion of prosthetic valve endocarditis
EANM'12 - MILAN 2012

2.2. PRESENTATIONS AFFICHEES :

Benali K, Slama.J, Burg S, Hassani H, Sorbets E, Hyafil F, Rouzet F, Sarda L, Le Guludec D**.**
Intérêt de la TEP au 18-FDG dans le diagnostic d'anévrysme mycotique : A propos de 3 cas
SFMN Rouen 2013

Benali K, Rouzet F, Ben Azzouna R, Petiet A, Louedec L, Milliner M, Sarda-Mantel L, , D Chicco, A Filannino, Michel JB, Le Guludec
Comparison between 99mTc-labeled HYNIC-Annexin A5 and Annexin A5-128 for the *in vivo* diagnosis of experimental infective endocarditis
Ce travail a eu le prix suivant :
SECOND PLACE POSTER-CARDIOVASULAR TRACK, Supported by the SNM cardiovascular Council 12 June 2012

ANNEXES :

Fax émis par : +33155873452 ANSM/DP1 29-05-15 15:23 Pg: 1/1

ansm
Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE DE MÉDICAMENT A USAGE HUMAIN

Nombre de pages : 1
(incluant la page de garde)

Envoi par Télécopie

Date :

Identifiants de l'essai clinique					
Titre	Evaluation de la rhAnnexine V-128 radiomarquée dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse et de ses complications emboliques				
Promoteur	INSERM			Réf. CPP	/
Réf. Promoteur	C13-38 (AnnIE)	N° EudraCT	2014-004260-38	Réf. ANSM	**150121A-12**

Expéditeur
ANSM / Direction des médicaments en oncologie, hématologie, immunologie et néphrologie Pôle Oncologie solide, radiopharmaceutiques, produits de contraste et de diagnostic
Dossier suivi par : ANNICK NJONGA Tél : 33 (0) 1 55 87 34 97 / 34 63 - Fax : 33 (0) 1 55 87 34 52

Destinataire (demandeur : nom / société / tél.)	
Claire LEVY MARCHAL INSERM 331 44236047	
Fax	**01 44 23 67 10**

CPP destinataire en copie	**Ile-de-France I (Paris-Hôtel Dieu)**	**Fax**	**01.42.34.86.11**	
INCA destinataire en copie (oncologie)		**Fax**	**01 41 10 14 45**	
ASN destinataire en copie (produits radiopharmaceutiques		**Fax**	**01 46 16 44 28**	

Vu le code de la santé publique et notamment ses articles L. 1123-8, L. 1123-12 et vu le dossier de demande d'autorisation d'essai clinique adressé à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) ;

Vu les compléments versés par le promoteur en date du 08/04/2015 et du 27/04/2015, suite à la demande de l'ANSM ;

L'autorisation mentionnée à l'article L. 1123-8 du code de la santé publique est accordée pour l'essai clinique cité en objet. Cette autorisation est valable pour toute la durée de l'essai à compter de la date de la présente décision.

Toutefois, conformément à l'article R. 1123-33 du code de la santé publique, la présente autorisation devient caduque si la recherche n'a pas débuté dans un délai d'un an.

Le chef produits oncologie, radiopharmaceutique
Direction des médicaments en oncologie, hématologie, immunologie, néphrologie
28 MAI 2015
Vincent GAZIN

Je vous demande de transmettre toute demande d'informations complémentaires concernant ce dossier par courriel adressé à la boite : ams-essaisclinigues@ansm.sante.fr . Je vous précise qu'il vous est possible d'utiliser à cet effet le système de messagerie électronique sécurisée Eudralink. Lors de l'envoi de ces dossiers, je vous demande de veiller à reporter dans l'objet du message les mentions suivantes :
- pour les MS transmises à l'ANSM pour information : **MSI/ Réf ANSM du dossier**
- pour les MS soumises pour autorisation ou pour les dossiers mixtes (comportant des modifications soumises pour autorisation et d'autres pour information) : **MSA/ Réf ANSM du dossier**

Si vous ne recevez pas toutes les pages de cette télécopie, veuillez contacter le secrétariat de la Direction Produit ONCOH au : 33 (0) 1 55 87 34 97 ou 33 (0) 1 55 87 34 63

Confidentialité
Cette transmission est à l'attention exclusive du(des) destinataires ci-dessus mentionné(s) et peut contenir des informations privilégiées et/ou confidentielles. Si vous n'êtes pas le destinataire voulu ou une personne mandatée pour lui remettre cette transmission, vous avez reçu ce document par erreur et toute utilisation, révélation, copie ou communication de son contenu est interdite. Si vous avez reçu cette transmission par erreur, veuillez nous en informer par téléphone immédiatement et nous retourner le message original par courrier. Merci.

Confidentiality
This transmission is intended to the addressee(s) listed above only and may contain preferential or/and confidential information. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that you have received the document by mistake and any use, disclosure, copying or communication of the content of this transmission is prohibited. If you have received this transmission by mistake, please call us immediately and return the original message by mail. Thank you.

From:CPP ILE DE FRANCE 1 To:00144236126 16/05/2015 20:58 #724 P.001/002

COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES - Ile de France 1

CPP ILE DE France I – N°IRB : 00008522 – responsable administrative : Hélène de Crécy
Hôtel-Dieu – 1, Place du Parvis Notre-Dame – 75181 PARIS cedex 04
Tél. : 01 42 34 80 52 – Port. 06 63 34 80 52 – Fax : 01 42 34 86 11 –
Adresse électronique principale : cpp.iledefrance1@htd.aphp.fr - Adresse électronique en copie de la première : cppiledefrance1@orange.fr

Frédérique ELIE
Chargée Affaires Réglementaires et Pharmacovigilance
BIOPARK
Bâtiment A - 1er et 2ème étages
8 rue de la croix Jarry
75013 PARIS

Tél. Ext : +33 (0)1 44 23 60 47
Fax. : +33 (0)1 44 23 61 26
Email : frederique.elie@inserm.fr

Envoi de l'avis par fax à Mme Sonia GUEGUEN
Email : rqrc.siege@inserm.fr
Fax 01.44.23.67.10

Paris, le 15 mai 2015

Nos références CPP Ile de France 1 - NUMERO DOSSIER : 2015-fév.-13818

Le 3 février 2015, le Comité a été saisi d'une demande d'avis initiale concernant le projet de recherche biomédicale portant sur un produit de santé intitulé : **Evaluation de la rhAnnexine V-128 radiomarquée dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse et de ses complications emboliques**

- **Promoteur** : INSERM
- **Investigateur principal** : Dominique LEGULUDEC (Service de Médecine Nucléaire, GH Bichat Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18

Le comité a adopté, mardi 12 mai 2015, la délibération suivante :

AVIS FAVORABLE

Cet avis est valable un an à partir de la date de son émission. Il porte sur les éléments initialement soumis au CPP ainsi que les documents modifiés à la demande de celui-ci.

Le dossier initial soumis au CPP est composé des éléments suivants :

DOSSIER ADMINISTRATIF	Courrier de demande d'avis	18/12/2014
	Formulaire de demande d'avis	18/12/2014
	Document additionnel	18/12/2014
	Support de recrutement	N/A
	Lettre autorisant le demandeur à agir pour le compte du promoteur	N/A
	Copie autorisation de lieu	
	Confirmation n° EudraCT/ IDRCB	

COMPOSITION :
Président : Christophe BARDIN ; Vice-Président : Jean-Michel ZUCKER
Secrétaires Scientifiques : Catherine GRILLOT-COURVALIN, Magali SEASSAU
Trésorière : Elisabeth FRIJA-ORVOEN

Autres membres :
Marianne BARRIERE ; Florent CHARDONNET ; Nathalie DAFFOS ; Marc DELPECH ; Vianney DESCROIX ; Samuel FITOUSSI ; Pierre FRANTZ ; Danielle GOLINELLI ; Cécile KORONKIEWICZ ; Catherine LABRUSSE-RIOU ; Catherine MAZIN ; Jean-Louis PERIGNON ; Marie-France POIRIER ; Elisabeth TRAIFFORT ; Jacques TRETON

RESUME EN FRANCAIS

Actuellement l'imagerie du thrombus artériel ou thrombus intra-luminal se base sur l'imagerie morphologique. Celle-ci ne permet pas d'évaluer l'activité biologique du thrombus, ni de prédire son évolution. Dans ce contexte l'imagerie moléculaire du thrombus a pour principaux objectifs (1) la détection du thrombus initial et la recherche de localisations secondaires, (2) l'évaluation du potentiel évolutif du thrombus et de son impact sur les tissus environnants en relation avec son activité biologique, (3) l'évaluation précoce de l'efficacité thérapeutique (avant une modification morphologique). Ce travail constitue la suite d'une application originale de l'imagerie de la PS, impliquée dans l'apoptose cellulaire et de l'activation plaquettaire, permettant ainsi la détection du thrombus, en particulier du thrombus infecté tel que rencontré dans l'endocardite infectieuse. Nous avons 1) testé un peptide ciblant la PS : le 68Ga-P04087, en vue d'une imagerie TEP de la PS. Les résultats radiopharmaceutiques sont satisfaisants contrastant avec l'absence d'un signal scintigraphique. 2) validé en pré-clinique des kits GMP d'un variant chimique de l'annexine : l'AnxA5-128 en la comparant avec la HYNIC-AnxA5 sur les modèles d'endocardite infectieuse (imagerie de la PS sur plaquettes activées) et de myocardite auto-immune chez le rat (imagerie de la PS sur les cellules apoptotiques). 3) mise en place d'un protocole clinique ayant pour but d'effectuer la preuve de concept clinique d'imagerie moléculaire du thrombus par l'AnxA5-128, en particulier le thrombus infecté de l'endocardite infectieuse et les localisations secondaires. Ceci a nécessité l'élaboration de tous les dossiers administratifs se soldant par des avis favorables du comité de protection des personnes (CPP) et un accord de l'ANSM, ainsi que la mise en place d'essai translationnel de preuve de concept clinique. Les premiers résultats analysés sur les 10 patients avec une suspicion d'EI inclus dans la phase I de l'étude de tolérance sont prometteurs aussi bien sur le plan de la sécurité du radiotraceur que sur la sensibilité de détection du thrombus infecté. Le comité de surveillance indépendant a donné un avis favorable.
Mots-clés : Phosphatidylsérine, Imagerie moléculaire, TEP, TEMP, Annexine, endocardite, thrombus

RESUME EN ANGLAIS

Currently the imaging of the arterial thrombus or intra-luminal thrombus is based on morphological imaging. This modality does not provide information on the possible evolution of the thrombus in relation to its biological activity. In this context, the molecular imaging of thrombus has for main purpose (1) the detection of the initial thrombus and the search for secondary locations, (2) the evaluation of the evolutionary potential of the thrombus and its impact on the surrounding tissues in relation to its biological activity, (3) early evaluation of therapeutic efficiency (before morphological modification). This work is a continuity of an original application of the PS imaging, a witness of cell apoptosis and platelet activation, thus allowing the detection of thrombus, in particular the infected thrombus infected as encountered in endocarditis infectious. We have 1) tested a peptide targeting PS: 68Ga-P04087, for PET imaging of PS. The radiopharmaceutical results are satisfactory contrasting with the absence of a scintigraphic signal. 2) validated GMP kits of a chemical variant of annexin: AnxA5-128 in comparison with HYNIC-AnxA5 on of infectious endocarditis models (imaging of PS on activated platelets) and autoimmune myocarditis in rats (imaging of PS on apoptotic cells). 3) set up a clinical protocol with a principal aim a clinical proof of concept of molecular imaging of thrombus by AnxA5-128, in particular infected thrombus of infective endocarditis and emboli sites. This clinical trial has been approved by the ethics committee (CPP) and an agreement of the ANSM. The phase I of tolerance of 10 patients with suspicion of IE is completed. The results are promising both in terms of the tracer safety and of infected thrombus detection. DSMB gave a favorable opinion.
Keywords: phosphatidyl serine, molecular imaging, SPECT, PET, Annexin, endocarditis, thrombus