

Direction de l'Évaluation des Médicaments Et des  
produits Biologiques  
Département de toxicologie  
Chef de département : D. Masset  
Secrétaire scientifique : A. Sanh

## POSITION PAPER SUR L'IMAGERIE EN TOXICOLOGIE

Version n°1 du 30 juillet 2009

Document préparé par le Groupe de Travail « Innovation non Clinique »

➤ **Coordinateurs de la rédaction**

- A. LE PAPE
- S. LERONDEL
- J. GUILLEMAIN

➤ **Président**

- J.-R. CLAUDE

➤ **Membres**

- L. DOMENJOUR
- E. FATTAL
- J. GUILLEMAIN
- A. GUILLOUZO
- S. LE CROM
- A. LE PAPE
- S. LERONDEL
- P. LESCUYER
- F. MOREL
- M. PALLARDY
- C. PINEAU
- T. RABILLOUD
- R. RAHMANI
- D. TREMBLAY<sup>†</sup>

➤ **Expert invité**

- C. COROT

➤ **Représentants de l'Afssaps invités**

- D. ABDON
- D. SAUVAIRE

## Position paper sur l'imagerie en toxicologie Version 1 du 30 juillet 2009

Issues de l'imagerie médicale, les modalités d'imagerie in vivo 2D et 3D exploitées chez l'animal constituent une ressource considérée comme stratégique pour la recherche biomédicale et l'innovation pharmaceutique (Strack et al., 2007), compte tenu de son caractère non-invasif, de la possibilité d'un suivi longitudinal des animaux et son adéquation avec la démarche translationnelle : « it is well acknowledged throughout the industry that the application of preclinical to clinical translational biomarkers is an important strategy that holds promise in increasing the confidence in the translatability of the preclinical to clinical data » (Stephenson DT et al., 2008).

Pour l'exploration du moyen animal (chien, miniporc, primate) et pour le rat de 250-300g, les équipements de l'imagerie médicale présentent des performances tout à fait adaptées en terme de résolution et de sensibilité.

Par contre, pour le petit animal, principalement la souris, des innovations technologiques majeures ont été nécessaires et ce n'est que très récemment que des imageurs dédiés ont atteint un degré de maturité qui les rend désormais exploitables, de manière quantitative, avec les mêmes performances comparatives que les examens réalisés chez l'homme.

L'imagerie est déjà partie intégrante de certaines études de **pharmacologie d'activité** dans le développement de nouvelles molécules. Il en est ainsi des études d'histomorphométrie pour l'évaluation des rapports intima/média ou de l'analyse des surfaces et volumes de plaques d'athéromes dans le domaine cardio-vasculaire. Certains examens pratiqués chez l'homme sont directement transposables aux études de **pharmacologie de sécurité** ; il en est ainsi de la vidange gastrique, du transit intestinal et des fonctions rénales.

L'utilisation de molécules marquées dans les études de **cinétiques** et de **biodistribution** est classique avec l'autoradiographie quantitative corps entier dont l'évolution in vivo est la tomographie par émission de positons au Carbone 11.

La mise en œuvre des modalités d'imagerie dans le domaine de la **toxicologie**, parallèlement à ses contributions éthiques, scientifiques et économiques, doit cependant intégrer d'emblée les contraintes des études concernant la sécurité des médicaments. Celles-ci peuvent imposer des développements spécifiques pour les équipements (confinement des animaux, CF21 part 11) ou de nouvelles conditions d'exploitation (GLP) pour des équipements dont la haute technologie et les coûts conduisent le plus souvent à une exploitation en plateformes publiques en partenariats avec des structures privées (laboratoires pharmaceutiques, start up, CROs en pharmaco-toxicologie).

C'est dans ce contexte qu'a été élaboré un état des lieux des techniques existantes et des domaines d'application potentiels en tenant compte des contraintes d'exploitation.

### I- Les techniques d'imagerie applicables au petit animal

Une synthèse des différentes modalités d'imagerie envisageables pour les études de toxicologie est présentée en annexes 1 et 2.

L'implantation des ressources d'imagerie s'avère une opération très délicate pour des raisons de coût et d'infrastructure, mais également par la nécessité d'un personnel hautement spécialisé avec des postes pérennes (biophysiciens, biologistes-imageurs, radiochimistes,

informaticiens...) et du maintien des appareils au meilleur niveau technologique dans un domaine récent et rapidement évolutif.

Les modalités applicables à l'imagerie de l'animal peuvent être séparées en 2 groupes :

**-pour le premier, la détection et l'acquisition d'un signal proviennent de l'interaction des tissus avec différentes formes d'énergie.** C'est le cas de la **tomodensitométrie X (TDM)**, l'**Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)** et l'**imagerie par ultra-sons** qui fournissent des informations essentiellement anatomiques voire fonctionnelles, principalement dans le domaine cardiovasculaire.

**-pour le second groupe, le signal est directement émis in vivo par un traceur radiomarqué ou fluorescent, injecté dans l'organisme et spécifique d'une cible ou d'un processus physiologique ou moléculaire.** Il s'agit des modalités d'imagerie nucléaire comme la **gamma-scintigraphie**, la **Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP)**, la **Tomographie par Emission de Positons (TEP)** et l'**imagerie de fluorescence**.

Une modalité particulière dans ce groupe est l'**imagerie par bioluminescence**, de développement récent, et pour laquelle la transformation chimique in vivo d'un substrat préalablement injecté va entraîner in situ l'émission de photons lumineux.

Ces techniques apportent chacune des informations complémentaires et doivent par conséquent être exploitées en association pour répondre au questionnement biologique. Ainsi l'imagerie fonctionnelle (TEP, Fluorescence, Bioluminescence) permet d'obtenir des informations spécifiques et quantitatives sur un processus physiopathologique, l'imagerie anatomique (TDM) utilisée en bi-modalité, fournissant les repères indispensables à la localisation et à l'interprétation.

## **II- Les domaines d'application**

### II.1-Pharmacologie de sécurité

Au niveau de la « Safety core battery » (SNC, cardiovasculaire et respiratoire), la mise en œuvre des modalités d'imagerie, compte tenu de leur lourdeur et de leur coût, ne semble pas réaliste sauf dans un contexte prospectif ou explicatif, par exemple pour l'échographie cardiaque dans l'exploration des valvulopathies, sous réserve d'une validation préalable. Cependant, l'imagerie pourrait apporter une réelle contribution scientifique pour les études optionnelles par l'apport de données complémentaires, principalement pour le digestif et le rénal.

### II.2-Pharmacocinétique/Toxicocinétique

C'est dans ce domaine que l'imagerie *in vivo* est la plus contributive, principalement par les méthodes radioisotopiques, pour évaluer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. Elle est particulièrement adaptée à la détermination de l'exposition des organes cibles, par exemple dans le cas des médicaments vectorisés, après administration par les voies inhalée, orale, intraveineuse...

Une attention toute particulière doit être portée au choix du radioélément dont la période doit être compatible avec la durée du phénomène exploré et avec une procédure de marquage qui n'interfère pas avec les propriétés intrinsèques de la molécule étudiée.

La recevabilité de cette approche *in vivo* est liée à la reconnaissance par les agences internationales du caractère quantitatif de la méthode qui doit être préalablement validée dans le modèle mis en œuvre. C'est le cas de la tomographie par émission de positons (Roselt P, 2004 ; Lee and Farde, 2006) et de la scintigraphie 2D (en l'absence de superposition d'organes fixants) mais pas de la TEMP à ce jour bien que la situation puisse évoluer à très court terme avec le développement des TEMP/TDM X.

L'émergence de la **Tomographie Moléculaire de Fluorescence** dans l'infrarouge chez le petit animal, avec une sensibilité et une possibilité de quantification proches des techniques isotopiques, ouvre des perspectives très intéressantes par l'exploitation de nombreux biomarqueurs et pour les études de biodistribution sur de longues durées (cas des Anticorps thérapeutiques par ex). Cette modalité tend à être proposée comme une alternative à la TEMP ou à la TEP chez le petit animal, en particulier pour la détection précoce et le suivi longitudinal du développement des tumeurs. Actuellement, la limite de cette méthode est liée d'une part aux performances des traceurs *in vivo* en termes de sensibilité et de spécificité et à la difficulté d'obtenir une quantification absolue de la biodistribution corps entier par suite des différences d'absorption et de diffusion dans les organes traversés par les photons. Par ailleurs la taille moléculaire des fluorochromes actuellement disponibles rend son utilisation généralement non pertinente pour marquer les petites molécules.

### II.3-Etudes toxicologiques

#### II.3 1 – Génotoxicité

L'analyse d'images est opérationnelle à travers la cytométrie de flux dans le test du micronoyau avec des avantages reconnus comme l'augmentation de l'échantillonnage permettant la mise en évidence d'événements rares, cela avec une diminution des coûts (De Boeck et al., 2005 ; Bryce et al., 2008). Le test des comètes fait lui aussi appel à de l'analyse d'image conduisant, là aussi, à optimiser la phase de lecture (Digue et al., 1999).

De nouvelles techniques de visualisation de l'ADN pourraient contribuer à l'évaluation du potentiel génotoxique des molécules.

#### II.3.2-Cancérogénèse

L'imagerie moléculaire, principalement par TEMP et TEP, a d'ores et déjà le potentiel de mettre en évidence à un stade millimétrique la majorité des tumeurs observées dans les études de cancérogénèse. Sa mise en œuvre devrait donc conduire à réduire significativement le délai d'obtention des informations.

Compte tenu des modalités d'imagerie lourdes à utiliser et de l'environnement extrêmement contrôlé des études de cancérogénèse, cette stratégie n'est envisageable que dans le cadre d'études « satellites » qui pourraient être organisées sur 6 à 12 mois, en particulier en utilisant des souris transgéniques dédiées. Dans cet objectif, il est impératif d'éviter tout biais lié à la mise en œuvre de l'imagerie : les agents de contraste devront être utilisés exclusivement à dose traceuse et l'effet radiobiologique devra être minimal, ce qui exclut l'utilisation systématique de la bimodalité X de repérage anatomique.

### II.3.3-Toxicité sur la fonction de reproduction

Le second segment portant sur le développement et la tératogénèse est susceptible de bénéficier significativement d'un apport de l'imagerie par tomодensitométrie X à haute résolution en alternative à l'examen des squelettes colorés par l'alizarine pour la recherche des anomalies osseuses. Actuellement, la moitié des effectifs est soumise à éviscération puis coloration, l'autre moitié étant consacrée aux examens viscéraux. Une tomодensitométrie X pratiquée sur chaque fœtus non éviscéré permettrait théoriquement d'obtenir 100% des informations sur la totalité de la population. Sous réserve d'une validation de la sensibilité et de la spécificité de la tomодensitométrie par rapport au test de référence, la démarche permettrait soit de doubler les informations avec les effectifs de fœtus actuellement mis en œuvre, soit de diminuer de 50% les effectifs actuels pour un niveau d'information identique. Les développements indispensables pour atteindre cet objectif portent sur le débit des examens par CT à haute résolution et la conception de logiciels de reconstruction 3D non opérateur dépendant. Des systèmes fonctionnant sur des bases statistiques pour l'identification automatique de formes permettraient de trier tous les spécimens normaux, les pathologistes se consacrant aux examens approfondis des seuls fœtus suspects à partir des différentes coupes 2D.

### II.3.4-Toxicité juvénile

Par son caractère non invasif et répétable, l'imagerie serait particulièrement adaptée à ces études pour suivre le développement des organes sur le plan anatomique (volume, forme par IRM ou TDM X) et fonctionnel (TEMP pour fonction hépato-biliaire, rénale, cardiaque). Certaines fonctionnalités pourraient être plus spécifiquement étudiées via la bioluminescence (Dohlen G. et al., 2008).

### II.3.4-Toxicologie explicative

#### II.3.4.1 – Hépatotoxicité

Dans son annexe I, le draft du dernier document EMEA (24/01/08) fait état de suggestions pour les études mécanistiques. Il n'est pas fait mention de l'imagerie qui, pourtant, pourrait contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes dynamiques de cette toxicité (Xu JJ et al., 2008).

Cette remarque s'applique à d'autres cibles, pour lesquelles l'imagerie peut être un des éléments de réponse à l'implication de phénomènes spécifiques ou non spécifiques (processus inflammatoire, prolifératif, apoptose, phagocytose....Cf. II.3.4.3).

#### II.3.4.2 – Cas particulier des aérosols

Dans le cas des aérosols, il est impératif de quantifier le dépôt du produit administré aux différents niveaux de l'arbre respiratoire, l'activité et la sécurité en découlant. En aval des études de modélisation, la TEMP est la technique de choix et c'est celle qui s'est imposée en recherche translationnelle puisque directement issue de l'exploration de la ventilation pulmonaire en médecine nucléaire.

#### II.3.4.3 – Souris transgéniques bioluminescentes

Il existe désormais un grand nombre de souris exprimant le gène rapporteur Luc ou LacZ qui s'exprimera sous le contrôle d'un promoteur activé lors d'un processus physiopathologique

donné. Elles permettent de visualiser et de quantifier des mécanismes aussi variés qu'un effet anti-androgène, une apoptose, l'implication des cytokines, des kinases ou de la voie NF-κB, l'induction d'une isoforme du cytochrome P450.... (Carlsen et al., 2002 ; Moskau J. et al., 2008)

### II.3.5 – Tolérance et/ou sensibilisation

L'évaluation du potentiel sensibilisant fait notamment appel au test LLNA qui utilise la thymidine tritiée (Basketter et al., 2001). La transposition de cette démarche à l'imagerie in vivo par fluorescence infra rouge ou par TEP avec des analogues de la 2-deoxycytidine de développement très récent représenterait une avancée très significative mais la validation de cette approche pour les études de toxicologie reste à établir (Radu et al., 2008).

### II.3.6 – Etude de la domiciliation cellulaire

Dans le cadre des thérapies cellulaires, en particulier par les cellules souches, ou pour l'étude du recrutement d'un type spécifique de cellules immunocompétentes au niveau d'un foyer pathologique, un marquage de ces cellules dans des conditions préservant leur activité biologique peut être réalisé par le Cuivre 64 pour l'imagerie TEP, par des sondes fluorescentes dans le proche infra rouge ou par les USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) pour l'IRM.

## **Imagerie et Qualité**

La mise en œuvre de l'imagerie pour les études de toxicologie doit satisfaire de nombreuses exigences de qualité incluant le contrôle des performances des équipements mais également une exploitation dans un environnement conforme aux BPL et en intégrant une démarche de validation globale de l'ensemble des processus, y compris les modèles animaux.

Les appareils d'imagerie sont constitués d'un système qui va détecter un signal et d'outils informatiques qui vont traiter celui-ci, pour générer une information qui constituera la donnée brute, à exploiter puis archiver. Une opération de validation doit permettre de démontrer que l'ensemble de la chaîne d'instrumentation est adapté aux tâches auxquelles il est destiné. Ainsi, la mise en œuvre de systèmes électroniques et informatiques générant des données sources pour les études de sécurité des médicaments doit être menée en conformité avec les prescriptions CFR21 Part 11 de la FDA (Tuomari et al., 2007).

Seuls les appareils les plus récents conçus pour l'exploration du petit animal commencent à intégrer les exigences du CFR21 Part 11 concernant les données et signatures électroniques, mais ces dernières sont totalement absentes pour le matériel d'imagerie médicale puisqu'il ne s'agit pas d'une norme de la spécialité.

## **Conclusion/Perspectives**

Comme il n'existe pas une technologie d'imagerie capable de répondre, seule, à l'ensemble des questions posées, des modalités complémentaires sont nécessaires (besoins d'imagerie fonctionnelle, moléculaire et anatomique) pour répondre au questionnement biologique.

Cette imagerie multimodalités peut être mise en œuvre en explorant les animaux par passages successifs dans différents imageurs ou par l'utilisation d'appareils hybrides tels que TEP ou TEMP (imagerie moléculaire) associés à une TDM X (repérage anatomique).

Ainsi, dans une étude de toxicologie d'un médicament administré par inhalation, l'imagerie radioisotopique permet de déterminer la biodistribution et l'exposition des organes cibles, tandis que l'imagerie moléculaire sera mise en œuvre pour mettre en évidence l'apparition de processus physiopathologiques.

De même, chaque ensemble d'équipements doit être adapté à la taille des animaux explorés : appareils médicaux pour le moyen animal et appareils dédiés pour le rat et la souris.

La mise en œuvre de l'imagerie in vivo pour les études de toxicologie doit donc intégrer des contraintes spécifiques liées aux performances des appareils, à la nécessité d'un confinement strict des animaux et aux exigences de qualité incluant les GLP et le CFR21 part 11.

La nécessité d'exploiter pour ces études des plateformes d'équipements lourds, implique le plus généralement l'exploitation de ressources communes dans le cadre de partenariats public-privé. A l'exception des études de toxicologie explicative purement scientifiques, pour les études de toxicologie réglementaire, il paraît souhaitable de dissocier dans les protocoles la **partie expérimentale** « technique », (à réaliser selon les règles de l'art dans un environnement conforme aux GLP et au CF21 part 11) de l'**interprétation** des images nécessitant un ou des experts qualifiés et pouvant être extérieurs à la structure.

En ce qui concerne la pertinence des protocoles d'imagerie dans les études de toxicologie réglementaire, elle pourrait être validée en s'inspirant des recommandations de la « Médecine Basée sur les Preuves » en imagerie médicale :

-un protocole ayant fait l'objet d'une validation histologique et d'une publication scientifique indépendante d'un laboratoire pharmaceutique aurait un niveau de recommandation de type A.

-si un protocole a été décrit dans plusieurs publications mais sans étude de validation histologique, une conférence de consensus impliquant les Sociétés Savantes concernées pourrait établir un niveau de recommandation de niveau A ou B.

Pour un protocole donné, la recommandation porterait sur la définition des indications, la phase expérimentale, l'imagerie, le traitement et l'interprétation des images.

Pour l'interprétation des images, une double lecture paraît souhaitable en s'assurant de la qualification des spécialistes : le nombre d'examens ou de lectures d'examens réalisés par an dans le domaine paraît un bon indicateur de qualification en attente de formations académiques spécifiques. Un autre mode de qualification pourrait s'inspirer des pratiques de l'histopathologie incluant le peer reviewing qui est désormais très facilité par la possibilité de transfert des images au format standard « Dicom » de l'imagerie médicale.



## Références bibliographiques

- [1] Strack T.  
Imaging as a tool in drug development.  
Drugs Today (Barc). 2007 ; 43 :725-36.
- [2] Stephenson DT, Arneric SP.  
Neuroimaging of pain : advances and future prospects.  
J Pain. 2008 ; 9 : 567-579.
- [3] Roselt P, Meikle S, Kassiou M.  
The role of positron emission tomography in the discovery and development of new drugs as studied in laboratory animals.  
Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2004 ; 29 :1-6.
- [4] Lee CM, Farde L.  
Using positron emission tomography to facilitate CNS drug development.  
Trends Pharmacol Sci. 2006 ; 27 : 310-316.
- [5] De Boeck M, van der Leede BJ, Van Goethem F, De Smedt A, Steemans M, Lampo A, Vanparys P.  
Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes: Time- and dose-dependent response of known mutagens in mice, using multiple blood sampling.  
Environ Mol Mutagen. 2005 ; 46 :30-42.
- [6] Bryce SM, Avlasevich SL, Bemis JC, Lukamowicz M, Elhajouji A, Van Goethem F, De Boeck M, Beerens D, Aerts H, Van Gompel J, Collins JE, Ellis PC, White AT, Lynch AM, Dertinger SD.  
Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content in vitro micronucleus assay.  
Mutat Res. 2008 ; 650 :181-95.
- [7] Digue L, Orsière T, De Méo M, Mattéi MG, Depetris D, Duffaud F, Favre R, Botta A.  
Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes.  
Environ Mol Mutagen. 1999 ;34 :269-78.
- [8] Dohlen G, Odland HH, Carlsen H, Blomhoff R, Thaulow E, Saugstad OD.  
Antioxidant activity in the newborn brain: a luciferase mouse model.  
Neonatology. 2008 ; 93 :125-31.
- [9] Xu JJ, Henstock PV, Dunn MC, Smith AR, Chabot JR, de Graaf D.  
Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury  
Toxicol Sci. 2008 ; 105 : 97-105.
- [10] Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R.  
In vivo imaging of NF-kappa B activity.  
J Immunol. 2002 ; 168 :1441-6.



- [11] Moskaug JØ, Carlsen H, Blomhoff R.  
Noninvasive in vivo imaging of protein kinase a activity.  
Mol Imaging. 2008 ; 7 :35-41.
- [12] Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I.  
Measurement of allergenic potency using the local lymph node assay.  
Trends Pharmacol Sci. 2001 ; 22 :264-5.
- [13] Radu CG, Shu CJ, Nair-Gill E, Shelly SM, Barrio JR, Satyamurthy N, Phelps ME, Witte ON.  
Molecular imaging of lymphoid organs and immune activation by positron emission tomography  
with a new [18F]-labeled 2 $\phi$ -deoxycytidine analog 2008  
Nature Medicine 2008 ; 14 : 783-788.
- [14] Tuomari DL, Kemp RK, Sellers R, Yarrington JT, Geoly FJ, Fouillet XL, Dybdal N, Perry R;  
Society of Toxicologic Pathology.  
Society of Toxicologic Pathology position paper on pathology image data: compliance with 21  
CFR Parts 58 and 11.  
Toxicol Pathol. 2007 ; 35 :450-5.

## **ANNEXE 1 : Principe des différentes modalités d'imagerie**

### **I-Modalités basées sur la mise en œuvre de radioisotopes**

Ces imageries fonctionnelles et moléculaires reposent sur la détection de radiotraceurs administrés le plus souvent par voie iv.

L'agent de contraste est dans ce cas un radiotraceur qui est une sonde moléculaire, conçue pour interagir avec des molécules cibles ou un processus biologique, et dont le marquage par un isotope radioactif, le marqueur, permet la localisation dans l'organisme. Il est injecté à une dose très faible, généralement sans activité pharmacologique (10 pg à 10µg).

#### **1-Scintigraphie planaire**

La scintigraphie planaire est une imagerie 2D basée sur la détection de radioéléments émetteurs de rayons gamma à vie courte (principalement Technétium 99m, Iode 123, Indium 111).

Le radiotraceur est détecté grâce à une gamma caméra qui permet d'obtenir une image 2D correspondant ainsi à la projection du volume étudié sur un plan. En l'absence de superposition de foyers actifs, le caractère quantitatif de cette imagerie 2D est validé par les agences internationales.

#### **2-Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP) ou SPECT (de l'anglais Single Photon Emission Computed Tomography) ou Tomoscintigraphie**

Cette modalité repose sur le même principe que la scintigraphie mais par rotation de la caméra autour du sujet, elle permet une représentation numérique en 3D et une meilleure résolution de la distribution du radiotraceur.

Bien qu'exploitée quantitativement depuis de nombreuses années en médecine comme en recherche chez l'animal, la tomoscintigraphie n'est pas encore reconnue pour fournir des données quantitatives absolues pour les études de biodistribution des médicaments.

#### **3-Tomographie par Emission de Positons (TEP)**

A la différence de la scintigraphie ou de la TEMP où un seul photon gamma est émis lors de la désintégration radioactive, dans le cas de la Tomographie par Emission de Positons, deux photons vont être détectés. Cette propriété permet de détecter avec une grande précision la localisation in vivo du radiotraceur et sa quantification absolue.

Ce type d'imagerie, exclusivement 3D, nécessite des isotopes à durée de vie courte produits dans un cyclotron, le plus généralement le Fluor 18, le Cuivre 64 et le Carbone 11.

### **II-Modalités basées sur la mise en œuvre de rayons X**

#### **1-Radiologie X 2D**

La radiologie conventionnelle 2D réalise une image d'un organisme qui est la projection d'un volume sur un plan et dont le résultat traduit les différences d'absorption des éléments constitutifs de l'objet radiographié.

## **2-Tomodensitométrie X**

Le scanner X ou tomodensitomètre ou en anglais CT (pour Computed Tomography) permet de pallier le principal défaut de la radiologie conventionnelle en réalisant une tomographie en 3D associée à une mesure du coefficient d'atténuation du faisceau de rayons X par les tissus traversés.

En complément de ses applications propres, la tomodensitométrie X est de plus en plus associée aux imageries fonctionnelles (TEP, SPECT, Fluorescence). Cette exploitation bimodale permet d'améliorer la quantification par correction de l'absorption tissulaire et une meilleure localisation anatomique des foyers détectés.

Dans les 2 cas (radiologie 2D, tomodensitométrie), à l'exception de l'examen du squelette et des poumons, des agents de contraste sont nécessaires pour une opacification des compartiments étudiés. Ils sont le plus souvent à base d'iode ou de sulfate de baryum (dose administrée 20-50 mg). On note l'émergence de quelques agents de contraste ciblés.

## **III-Imagerie par résonance magnétique**

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basée sur les caractéristiques de la résonance des atomes d'hydrogène lorsque le specimen, placé dans un champ magnétique statique est soumis à un champ magnétique variable à haute fréquence. En fonction du microenvironnement moléculaire de ces atomes, il est possible de visualiser l'anatomie de très nombreuses structures. Ses applications sont multiples : imagerie morphologique avec un grand contraste tissulaire, imagerie fonctionnelle du mouvement, des flux, de la perfusion.

Une application particulière est la spectroscopie de résonance magnétique qui permet d'obtenir la composition biochimique d'une région d'intérêt à partir d'un volume localisé spatialement par IRM.

Cette technique fait largement appel à une palette d'agents de contraste (utilisant le gadolinium et le fer) modifiant la relaxation des protons de l'eau, avec le développement très actif de formes ciblées pour obtenir des informations fonctionnelles, moléculaires ou cellulaires (dose injectée : 100µg à 2mg).

## **IV-Imagerie photonique**

Le développement de caméras CCD ultrasensibles à très haute résolution rend aujourd'hui possible la détection de photons directement *in vivo* chez le petit animal.

La lumière étudiée peut être obtenue par bioluminescence ou fluorescence.

### **1-Imagerie de bioluminescence**

La bioluminescence est le résultat d'une réaction enzymatique impliquant le plus souvent la luciférase de la luciole (*Photinus pyralis*) et son substrat la luciférine selon un mécanisme dépendant du métabolisme.

Cette méthode permet une imagerie de l'expression du gène de la luciférase *in vivo* de façon non invasive pour analyser la régulation d'un gène endogène, évaluer l'efficacité d'une thérapie génique ou suivre la croissance et la migration de cellules tumorales exprimant la luciférase.

Récemment, des souris transgéniques exprimant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur spécifique ont été développées pour des applications en pharmacologie et toxicologie (IL-1, TNF, cox, isoformes du cytochrome P450).

## **2-Imagerie de fluorescence**

La fluorescence s'appuie sur la détection de fluorochromes après excitation transcutanée par une source de lumière de longueur d'onde définie. Pour limiter l'absorption des photons par les tissus biologiques, la fluorescence in vivo est essentiellement pratiquée dans le proche infrarouge.

Le fluorochrome peut être une protéine exprimée directement au sein des cellules, comme la GFP (Green Fluorescent Protein) par exemple, ou ce peut être une petite molécule organique greffée sur un composé d'intérêt.

L'imagerie en fluorescence offre la possibilité de suivre en temps réel de façon non invasive des biodistributions. De plus, avec le développement de sondes fluorescentes spécifiques il devient possible de cibler des récepteurs et d'imager des processus biologiques tels que des activités enzymatiques.

Des développements instrumentaux sont en cours pour rendre cette modalité d'imagerie quantitative, avec notamment la mise au point d'appareils de tomographie de fluorescence autorisant une imagerie sans limitation de profondeur chez la souris exclusivement, ou de systèmes d'imagerie bi-modale associant la tomodensitométrie X et la tomographie de fluorescence.

(Dose injectée 3-5µg).

## **V-Imagerie ultrasonore**

L'échographie et le Doppler sont deux techniques d'imagerie médicale utilisant les propriétés des ondes acoustiques. Lors de la propagation (vibration) il y a transmission d'énergie d'une particule à une particule voisine.

L'élément essentiel d'un système échographique est le transducteur, qui agit à la fois comme émetteur et comme récepteur des signaux acoustiques. Il est mis en contact avec l'organisme à étudier à travers un gel de couplage qui assure une bonne adaptation d'impédance acoustique.

### **1-Echographie**

L'échographie utilise les variations de la vitesse de propagation des ondes acoustiques à travers les différents tissus. Le faisceau d'ultrasons émis par la sonde se propage au travers de l'organisme et est réfléchi par les différentes structures anatomiques qu'il rencontre selon la densité et la nature du milieu traversé. Le signal recueilli est ensuite traité, ce qui permet la visualisation des organes et des structures anatomiques.

### **2-Doppler**

Le Doppler utilise la différence entre la fréquence de l'onde acoustique émise et celle de l'onde réfléchi lorsque la cible est en mouvement : typiquement les globules rouges.

Le Doppler permet ainsi de mesurer notamment la direction et la vitesse du flux dans les vaisseaux sanguins. Cette technique permet une imagerie dynamique d'organes comme le cœur à une fréquence de quelques dizaines d'images par seconde.

Les agents de contraste ultrasonore sont constitués de microbulles associant un gaz de bas poids moléculaire (perfluorocarbone, hexafluorure de soufre) et une enveloppe stabilisante (phospholipides, albumine, etc.).

(Dose injectée : 10-20µg d'hexafluorure).

## ANNEXE 2 : Tableau de synthèse sur les modalités d'imagerie in vivo actuellement disponibles

Modalité	Principe physique	Résolution	Durée des acquisitions	Avantages	Inconvénients
<b>TEP</b>	Rayons gamma 512 keV	1-2 mm	Minutes	Très grande sensibilité Quantification validée	Nécessite de disposer d'un cyclotron Irradiation de l'animal
<b>TEMP</b>	Rayons gamma 140-200 keV	1-2 mm	Minutes	Très grande sensibilité Quantification validée	Irradiation de l'animal
<b>IRM</b>	Ondes électromagnétiques	25-100µm	Minutes-heures	Très grande résolution	Faible sensibilité Temps d'acquisition long Temps de traitement d'images long
<b>TDM X</b>	Rayons X	50 µm	Minutes	Bonne résolution	Contraste faible dans les tissus mous Irradiation de l'animal
<b>Fluorescence</b>	Lumière visible et infra rouge	1-10 mm	Secondes-minutes	Très grande sensibilité  Pas de radiations ionisantes	Atténuation du signal par l'épaisseur de tissu (limite pour rat) Autofluorescence avec sondes émettant à moins de 750nm Quantification non validée
<b>Bioluminescence</b>	Lumière visible	1-10 mm	Minutes	Très grande sensibilité	Atténuation du signal par les tissus (limite pour rat)
				Pas de radiations ionisantes	Quantification non validée
				Donne information relative à la viabilité de la cellule	
<b>Echographie/Doppler</b>	Ultrasons	30-100 µm	Minutes	Pas de radiations ionisantes Agents de contraste non obligatoires	Grande dépendance vis-à-vis de l'opérateur Complexité de la validation de la quantification