



UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2019

THESE 2019 / TOU3 / 2054

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE
HOSPITALIERE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

CASTANIE INES

Née le 24 Novembre 1992, à Lagny-sur-Marne (77)

PRODUCTION D'UN MEDICAMENT RADIOPHARMACEUTIQUE EXPERIMENTAL CIBLANT LA PROTEINE TAU : FAISABILITE ET COÛT POUR LA RECHERCHE INSTITUTIONNELLE

Le 27 septembre 2019, à Toulouse

Directeur de thèse et membre du jury

Mme SALABERT Anne-Sophie, Assistant Hospitalo-Universitaire

JURY

Mme Couderc Bettina – Professeur des universités et Praticien hospitalier	Présidente
M.Tafari Mathieu – Maître de conférences des universités et Praticien hospitalier	1 ^{er} assesseur
Mme Couret Isabelle – Maître de conférences des universités et Praticien hospitalier	2 ^{ème} assesseur
M. Alonso Mathieu – Praticien hospitalier	3 ^{ème} assesseur

Liste des enseignants

PERSONNEL ENSEIGNANT

De la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier Au 1^{er} Janvier 2019

Professeurs Emérites

M. BENOIT H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie – Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie – Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie – Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUISSAC D (Vice Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie – Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie thérapeutique

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD -LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie- Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Chimie galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie- Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
Mme REYBIER- VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE- DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE- KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Assistant Associé des Universités

Mme MARTINI H.	Physiologie
----------------	-------------

Remerciements

A la présidente du jury,

A Madame le Professeur Bettina COUDERC,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aux membres du jury,

A Madame le Docteur Isabelle COURET,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger mon travail. Permettez-moi de vous témoigner ici l'expression de mon respect le plus sincère.

A Monsieur le Professeur Mathieu TAFANI,

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci pour votre accueil dans le service de la radiopharmacie, et pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A Monsieur le Docteur Mathieu ALONSO,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour tout ce que tu m'as appris durant ces deux semestres et demi. Et un grand merci pour m'avoir fait découvrir et aimer le monde de la radiopharmacie.

A ma directrice de thèse,

A Madame le Docteur Anne-Sophie SALABERT,

Je te remercie d'avoir accepté d'encadrer ma thèse, tu as su te rendre disponible et à l'écoute. Ce fut un réel plaisir d'avoir travaillé avec toi. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Un grand merci aux différentes équipes avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant mon internat, en particulier les services de radiopharmacie :

- Au CHU : merci à toute l'équipe de médecine nucléaire, les manips, les médecins et les préparateurs notamment Emilie, Mary, Chloé, Laeti, Bérangère, Nico, FX et leur cadre Marie-Blanche.
- A l'Oncopole : merci à Séverine et Mathilde pour votre accueil et votre disponibilité, ainsi qu'aux préparatrices Cindy, Amandine, Roxane, Nelly et Laurie. Merci à Chloé même si nous nous sommes croisées que quelques semaines.

A ma famille :

A mes parents, merci pour votre soutien et vos encouragements durant ces longues années d'études. Merci de m'avoir donné les moyens de réussir et de me soutenir dans tout ce que j'entreprends.

Merci pour cette force de caractère que vous m'avez transmise (c'est l'hérité des caractères acquis, tu vois papa ça existe !!), votre écoute et votre présence. Maman, je ne te remercierai jamais assez pour tous les plats que tu m'as cuisiné !

Pour tout l'amour que vous me portez et qui fait ce que je suis aujourd'hui, j'espère que vous êtes fiers de moi, autant que je suis fière de vous.

A Tom, mon PETIT frère,

Je suis si fière d'avoir un frère comme toi ! Tu as toujours su m'écouter, avoir les mots justes pour me rassurer et me faire relativiser ! Comme tu dis toujours « Mais c'est pas grave, ça va s'arranger !!! » et tu as raison. Merci pour tous ces moments passés avec toi et cette belle complicité entre nous. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie d'arracheur de dent, mais aussi dans ta vie personnelle avec Joséphine (à qui je souhaite à mon tour bien du courage !). Je serai toujours là pour toi (et aussi pour garder Pancake... !)

A mon papy, merci d'avoir toujours été présent et de t'être intéressé à tout ce que je faisais. Merci pour tout ce que tu m'as apporté et à ces inoubliables vacances à Réquista !

A mes grands-parents,

J'aurais tant aimé que vous soyez tous là aujourd'hui... Pour tout l'amour que vous m'avez donné, je vous dédie cette thèse.

A Pit et Marie, merci pour tout et surtout merci d'être venus me chercher à la gare tous les dimanche soir durant la première année sans quoi je n'aurais pas survécu !

A la famille Garochaud, pour votre présence depuis mon enfance, vous faites réellement partie de ma famille.

A Béatrice et Patrice,

Je vous remercie pour votre accueil chaleureux. Merci à Béatrice pour toutes vos petites attentions qui m'ont toujours touché et un grand merci à Patrice d'avoir été au top et toujours disponible pour les nombreux travaux (plus que pour la pose des sur plinthes !!)

A Violaine et Hugo,

A tous ces bons moments que l'on passe ensemble, et particulièrement aux soirées jeux de sociétés ! #Hugomauvaisperdant

A Matthieu,

Un immense merci de me soutenir (supporter !!!) au quotidien. Merci pour ta patience, ton écoute et tes relectures ces derniers mois. Merci pour tous ces moments de bonheur passés à tes côtés, et pour tous ceux à venir (quand tu seras redescendu en Province évidemment !)

A mes amis,

Ju et Cha,

Ju tu as été ma source d'inspiration pour la fabrication de tes cachets : tu as fait naître en moi une vocation ! (Heureusement qu'Adri va enfin pouvoir prendre le relais !) Cha tu en es également l'instigatrice en prêchant ta « sainte » parole et tes conseils « divins » à tes séraphins ! Plus sérieusement, merci à vous 2 de toujours avoir été présentes, pour votre soutien indéfectible depuis toutes ces années que je ne peux même plus compter (Cha en espérant que tu reviennes vite en France quand tu auras fini de cuisiner dans le monde entier !)

A la team des soirées sur Tarbes,

Chachou, pour ton amour de la montagne et du Captain Morgan. Merci de m'avoir fait rêver les jours de pluie au collège... J'en ris encore.

Chacha, pour ta présence et ton soutien, je ne te remercierai jamais assez.

Lysiane, Clément et Ariane, merci pour ces soirées poker ou crémaillères inoubliables !
#confettisenfolie

Merci à Eline, sans qui je n'aurais même pas franchi l'étape de la PACES. Merci d'être venue me parler ce premier jour devant les amphis, je te dois beaucoup... !!!! Et merci à Toto de m'avoir ramené une « surprise » pour nos premières vacances post-concours. Je vous souhaite beaucoup de bonheur en Bretagne (même si c'est loin et qu'il pleut) !

A Seb, un grand merci pour ces séjours au ski toujours très animés. A quand une nouvelle petite valse sur les pistes ?!

Un énorme merci à Anne, Sarah et Rikiki minus. Grâce à vous, passer l'été à réviser le concours de l'internat fut (presque) un plaisir !! Entre nos folles discussions, tutos youtube et nos soirées sushis on y est quand même arrivées !

A Titi et Léa, pour ce premier semestre inoubliable. Que de fous rires entre la vaseline sur le pare-brise (qui a gâché un jour de congé !) et le « supervirus » sur l'ordinateur !

A Cécile et Chloé D., merci pour ce semestre passé avec vous à Agen, entre séances de sport intensives, soirées sushis et papotage !

A Marie B et François pour cette passion de la radiopharmacie que vous m'avez transmise. François je ne te remercie toujours pas pour ces trèèèèes longues journées passées à Ranguel en ta compagnie. L'enfer... Heureusement que Marie est arrivée sur la colline !

A Kévin, merci pour ton hospitalité durant le DESC et pour ton soutien lors du retour dont je me souviendrai toute ma vie : ce n'est pas tous les jours qu'on met les chaînes pour sortir de Paris !

A ChaVert et PPuyo pour ce semestre follement intelligent. Enfin merci surtout à PPuyo qui m'a soutenue durant les nombreuses FA de ChaVert dans le but de révolutionner le Fer ! Encore désolée Arnaud et Adeline pour toutes ces nuisances sonores dans le bureau !

A mes co-internes de l'UPCO : Marine, Anne-Cecile, Pauline, Sylvain (t'es pas loin de ressembler à ton idole, ne lâche pas !!), Matthew (pour tous tes soupirs... !), Eléonore et Zaza (notre trio n'a pas fait le poids face au roi du planning ! Rémyvolution !!), Remymy (encore merci pour ta vidéo d'adieu), JB (à quand ce tour en bateau ?), PP (même si on ne peut pas t'appeler comme ça, c'est cadeau !).

A Cloclo, Sarah et Raton Râleur, merci pour toutes ces soirées toulousaines et pour nos week-ends ensemble toujours très bien organisés surtout au niveau de la météo ou de la difficulté de la rando ... ! La foudre n'aura pas eu raison de notre amitié !! Merci pour votre soutien, votre écoute et votre présence ces derniers temps !

Un grand merci à Céline (pour ton soutien et ton accueil lors des cours de master sur Bordeaux), à Alex (pour m'avoir permis de trouver une super école de danse), Laure (pour nos soirées et repas entre filles), Remi, Stéphanie, Chloé D (Vp de choc !), Margaux, Alix, Félicien (#Félichieur), et à mes profs et copines de la danse pour m'avoir permis de m'amuser et me changer les idées !

Table des matières

Liste des enseignants.....	3
Remerciements.....	5
Table des matières.....	9
Table des illustrations.....	13
Table des tableaux.....	15
Table des équations.....	15
Liste des abréviations.....	16
Introduction.....	18
I Physiopathologie des tauopathies.....	19
I.1 Génétique.....	19
I.2 Structure de la protéine tau.....	20
I.3 Fonctions de la protéine tau.....	21
I.3.1 Localisation cytosolique.....	21
I.3.1.1 Dynamique des microtubules.....	21
I.3.1.2 Transport axonal.....	23
I.3.2 Localisation à la membrane plasmique.....	24
I.3.3 Localisation nucléaire.....	24
I.4 Modifications post-traductionnelles de la protéine tau.....	25
I.4.1 La phosphorylation.....	25
I.4.1.1 Phosphorylation par des kinases.....	25
I.4.1.2 Déphosphorylation par des phosphatases.....	26
I.4.1.3 Acteurs indirects de la phosphorylation.....	27
I.4.2 La O-glycosylation.....	27
I.4.3 Autres modifications post-traductionnelles.....	27
I.5 Agrégation pathologique de la protéine tau.....	28
I.6 Toxicité de la protéine tau.....	30
I.7 Hypothèse de la propagation selon un mécanisme de type prion.....	31
I.8 La Maladie d'Alzheimer.....	31
I.8.1 Physiopathologie.....	32
I.8.2 Les plaques séniles.....	33
I.8.3 La dégénérescence neurofibrillaire.....	35

I.8.4	L'inflammation.....	37
I.8.5	Les différentes hypothèses sur les origines moléculaires de la MA	37
II	L'imagerie moléculaire.....	39
II.1.1	Définition d'un médicament radiopharmaceutique.....	40
II.1.2	Imagerie TEP.....	40
II.1.2.1	La production des radioéléments utilisées en TEP : principe de fonctionnement du cyclotron.....	41
II.1.2.2	Emetteur de positons.....	44
II.1.2.3	Caractéristiques d'un traceur TEP : radionucléide et molécule vectrice	45
II.1.2.4	La détection en imagerie TEP.....	47
II.1.3	Biomarqueurs de l'imagerie moléculaire dans la MA	48
II.1.3.1	Courbe d'évolution des biomarqueurs	49
II.1.3.2	Les biomarqueurs de l'amylose	50
II.1.3.2.1	[¹¹ C] -PIB	50
II.1.3.2.2	Marqueurs fluorés : le [¹⁸ F] -florbetapir, le [¹⁸ F] -florbetaben et le [¹⁸ F] -flutemetamol.....	51
II.1.3.3	Les biomarqueurs de la protéine Tau.....	53
II.1.3.3.1	Le [¹⁸ F] -FDDNP.....	54
II.1.3.3.2	Famille des THK	55
II.1.3.3.3	Le [¹¹ C] -PBB3.....	56
II.1.3.3.4	Famille des benzimidazoles pyrimidine.....	56
II.1.3.4	Les biomarqueurs de protéines de l'inflammation.....	57
III	Description du process de fabrication de l' [¹⁸ F] -AV1451	58
III.1	Synthèse de l' [¹⁸ F] -AV1451	58
III.1.1	Production de l'isotope [¹⁸ F].....	58
III.1.2	Synthèse du MRP	59
III.1.2.1	Le module de synthèse	59
III.1.2.2	Substitution nucléophile	60
III.1.2.3	Hydrolyse.....	61
III.1.2.4	Pré-purification sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction)	62
III.1.2.5	Purification HPLC	62
III.1.2.6	Mise en forme.....	63
III.2	Contrôles qualité sur le produit fini.....	64
III.2.1	Les contrôles qualité libératoires.....	64

III.2.2	Les contrôles qualité différés	65
III.2.3	Le dosage des solvants résiduels	66
III.3	Injection à un patient	67
III.4	Expédition d'un flacon pour un autre centre	67
IV	Etude de faisabilité et de coût pour la recherche institutionnelle.....	70
IV.1	Contexte.....	70
IV.2	L'exemple d'un MRPE ciblant la protéine tau.....	71
IV.3	Objectif de l'étude	73
IV.4	Méthode utilisée	73
IV.4.1	Recueil des coûts	74
IV.4.1.1	Rapport d'activité et prévisions.....	74
IV.4.1.2	Détermination des dépenses	75
IV.4.1.2.1	Dépenses de titre I	75
IV.4.1.2.2	Dépenses de titre II	75
IV.4.1.2.3	Dépenses de titre IV.....	76
IV.4.1.2.4	Charges LGG (Logistique et Gestion Générale)	77
IV.4.1.2.5	Charge de structure	77
IV.4.1.2.6	Dépense pour une expédition.....	77
IV.5	Résultats.....	78
IV.5.1	Bilan et activité prévisionnelle	78
IV.5.2	Détermination des coûts	80
IV.5.2.1	Montant global	80
IV.5.2.2	Détail des montants du titre I	83
IV.5.2.3	Détail des montants du titre II	84
IV.5.2.4	Détail des montants du titre IV.....	84
IV.5.3	Coût moyen pour une synthèse	85
IV.5.3.1	Coût pour un essai clinique institutionnel	87
IV.5.3.2	Coût pour la recherche fondamentale : [¹⁸ F] -AV1451	87
IV.5.3.3	Coût pour une production de [¹⁸ F] pour le projet PiR2	87
IV.6	Discussion.....	88
IV.6.1	Interprétation des résultats	88
IV.6.2	Limites de l'étude.....	90
IV.6.3	Perspectives.....	92
Conclusion	94

Références bibliographiques	95
Annexes	102
Serment de Galien	105

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du gène de la protéine Tau et de ses 6 isoformes	20
Figure 2 : Exemple de l'isoforme la plus grand de 441 AA de la protéine Tau	21
Figure 3 : Phosphorylation de Tau et dynamique microtubulaire	22
Figure 4 : Rôle de la protéine tau dans la stabilisation du cytosquelette par liaison aux microtubules et à l'actine	23
Figure 5 : Le transport axonal	24
Figure 6 : Agrégation de la protéine tau	28
Figure 7 : Phosphorylation de la protéine Tau : physiologique et pathologique.....	29
Figure 8 : Phosphorylation de la protéine tau et immunoréactivité aux anticorps.....	30
Figure 9 : Dégénérescence neuronale par excès de protéine tau soluble et sous forme d'oligomère.	31
Figure 10 : Les lésions caractéristiques de la MA	33
Figure 11 : Les voies de métabolisation de l'APP	34
Figure 12 : Hypothèse de formation du dépôt amyloïde.....	35
Figure 13 : Progression de la DNF au cours de la MA	36
Figure 14 : Médicament radiopharmaceutique.....	40
Figure 15 : Les différentes étapes de la réalisation d'un examen TEP	41
Figure 16 : cyclotron IBA du CHU de Toulouse	42
Figure 17 : Représentation schématique du fonctionnement du cyclotron	43
Figure 18 : Désintégration β^+	44
Figure 19 : Désintégration du $[^{18}\text{F}]$	44
Figure 20 : Annihilation du positon avec l'émission de deux photons γ	45
Figure 21 : Détection des photons γ en imagerie TEP	48
Figure 22 : Modèle hypothétique de la dynamique des biomarqueurs au cours de l'évolution en MA	49
Figure 23 : $[^{11}\text{C}]$ -PIB.....	50
Figure 24 : Imagerie TEP au $[^{11}\text{C}]$ -PIB.....	50
Figure 25 : Structure chimique des biomarqueurs fluorés de l'amylose.....	51
Figure 26 : Imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]$ AV45. En haut un sujet contrôle et en bas un sujet avec la MA	52

Figure 27 : Imagerie TEP au [18F]-florbetaben de deux sujets avec une démence. A gauche imagerie négative par TEP-amyloïde. A droite imagerie amyloïde positive.	53
Figure 28 : Structure chimique du [18F]-FDDNP	54
Figure 29 : Structure chimique des biomarqueurs de la famille des THK.....	55
Figure 30 : Structure chimique du [11C]-PBB3	56
Figure 31 : Structure chimique du [18F]-T807 ou [18F]-AV1451	57
Figure 32 : Relation entre plaques amyloïdes ([11C]PIB), métabolisme ([18F]FDG) et DNF ([18F]AV-1451) chez un patient avec une forte probabilité d'être atteint de la MA	57
Figure 33 : Module de synthèse	60
Figure 34 : Etape de substitution nucléophile du groupement chimique « partant » par l'atome de fluor radioactif lors de la radiosynthèse du [18F] -AV1451.....	61
Figure 35 : Etape de déprotection lors de la radiosynthèse de l'[18F] -AV1451	62
Figure 36 : Chromatogramme de purification sur colonne semi-préparative du [18F] -AV1451 avec double détection (UV et gamma) en sortie de colonne.....	63
Figure 37 : Pot plombé et éponge absorbante	67
Figure 38 : Pot en polyéthylène et mousse de calage.....	68
Figure 39 : Fût de transport et système de calage	68
Figure 40 : Exemple d'étiquetage pour expédition d'un MRPE.....	68
Figure 41 : Finalité de la production des MRPE au CHU de Toulouse	71
Figure 42 : Schéma du déroulement des imageries pour l'étude	72
Figure 43 : Pourcentage représenté dans chaque typologie de synthèse sur les six ans de l'étude	80
Figure 44 : Evolution des coûts de chaque titre par années	82
Figure 45 : Représentation de chaque dépense dans l'enveloppe totale	82

Table des tableaux

Tableau 1 : Fonctions de la protéine tau selon sa localisation	25
Tableau 2 : Les caractéristiques des principaux radioéléments utilisés en imagerie TEP	46
Tableau 3 : Caractéristiques principales des biomarqueurs fluorés de l'amylose.....	51
Tableau 4 : Principales caractéristiques des biomarqueurs de la famille des THK	55
Tableau 5 : Résumé des contrôles qualités réalisés sur l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 et spécifications attendues.....	66
Tableau 6 : Bilan du nombre de patients pour les essais cliniques et de doses pour la recherche fondamentale	78
Tableau 7 : Bilan du nombre de synthèses pour les essais cliniques et la recherche fondamentale	79
Tableau 8 : Montant global	81
Tableau 9 : Détail des montants du titre I	83
Tableau 10 : Détail des montants du titre II.....	84
Tableau 11 : Détail des montants du titre IV	85
Tableau 12 : Coût moyen d'une synthèse selon les dépenses annuelles.....	85
Tableau 13 : Détails des coûts : recherche et mise en place / essais clinique et recherche fondamentale	86
Tableau 14 : Bilan du coût moyen d'une synthèse selon la période considérée	86
Tableau 15 : Bilan des coûts de production pour les différents clients selon la période considérée	88
Tableau 16 : Tarif de facturation des doses.....	89

Table des équations

Équation 1 : Formation du $[^{18}\text{F}]$	59
Équation 2 : Période radioactive calculée à partir de la mesure d'un échantillon à deux temps différents.....	65

Liste des abréviations

ADI *Alzheimer's Disease International*
AHU *Assistant Hospitalo-Universitaire*
AMM *Autorisation de Mise sur le Marché*
ANSM *Agence Nationale de Sécurité du Médicament*
APP *Protéine Précurseur*
ASN *Autorité de Sureté Nucléaire*
BHE *Barrière Hémato-encéphalique*
CAMARI *Certificat d'Aptitude à Manipuler les Appareils de Radiologie Industrielle*
CE *Capture Electronique*
CHU *Centre Hospitalo-Universitaire*
CPP *Comité de Protection des Personnes*
CQ *Contrôles Qualités*
DAF *Direction des Affaires Financières*
DME *Dossier de Médicament Expérimental*
DMSO *Dimethylsulfoxide*
DNF *Dégénérescence Neurofibrillaire*
EMA *European Medicine Agency*
FDA *Food and Drug Administration*
HPLC *Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance*
INSERM *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*
IRSN *Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire*
MA *Maladie d'Alzheimer*
MAP *Protéines Associées aux Microtubules*
MBq *MégaBecquerel*
MMSE *Mini Mental Score Examination*
MRP *Médicament Radiopharmaceutique*
MRPE *Médicament Radiopharmaceutique Expérimental*
OMS *Mondiale de la Santé*
PCR *Personne Compétente en Radioprotection*
PH *Pharmacien Hospitalier*
PHF *Paires de Filament en Hélice*

PM *Personnel Médical*

PPH *Préparateur en Pharmacie Hospitalière*

PRC *Pureté RadioChimique*

PRN *Pureté radionucléidique*

ROS *Espèces Réactives de l'Oxygène*

tau *Tublin Associated Unit*

TEP *Tomographie par Emission de Positon*

TSPO *Protéine de Translocation*

Introduction

Un Médicament Radiopharmaceutique (MRP) est composé d'un isotope radioactif aussi appelé radionucléide. Ce dernier est chimiquement lié à une molécule vectrice ayant des propriétés biologiques spécifiques. Le vecteur est choisi pour sa capacité à cibler un organe ou une activité de l'organisme en fonction de ce que l'on souhaite observer.

Après administration du MRP, le patient doit être placé dans un appareil permettant la détection des émissions radioactives du radionucléide. Les signaux détectés sont traités par système informatique pour aboutir à une reconstitution tridimensionnelle de la distribution du traceur dans l'organisme. Cela permet de mesurer *in vivo* des paramètres physiologiques complexes comme le métabolisme cellulaire, l'activité synaptique d'une transmission neuronale.

L'imagerie nucléaire permet ainsi une imagerie fonctionnelle.

Nous allons nous intéresser au développement d'un MRP ciblant la protéine tau hyperphosphorylée. Cette protéine est une cible permettant de caractériser la mort neuronale notamment dans la Maladie d'Alzheimer (MA).

Dans cette thèse nous allons tout d'abord rappeler la physiopathologie de la MA et la formation des agrégats de protéine tau hyperphosphorylée. Nous nous intéresserons ensuite à la production du MRP permettant de suivre l'évolution de cette cible. La production des MRP pour la recherche fondamentale et pour les essais cliniques représente un investissement humain et financier dont le coût sera estimé dans le cadre de cette thèse.

I Physiopathologie des tauopathies

En 1975, la protéine tau (Tubulin Associated Unit) a été mise en évidence pour son rôle de conversion des dimères de tubuline en anneaux formant des microtubules *in vitro* (1). Elle appartient à la famille des Protéines Associées aux Microtubules (MAP) et est ensuite identifiée, en 1985, comme le constituant majeur des paires de filament en hélice (PHF) qui constituent la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans la MA (2). Cependant, l'agrégation de cette protéine tau est non spécifique de la MA : elle est retrouvée dans de nombreuses Tauopathies comme le syndrome Parkinsonien, la démence fronto-temporale, et les dystrophies myotoniques. C'est l'association de la DNF à une pathologie amyloïde qui est caractéristique de la MA.

I.1 Génétique

Le gène codant la protéine Tau est situé sur le chromosome 17 à la position 17q21 et s'étend sur plus de 100kb. L'ARNm de cette protéine est principalement exprimé dans les neurones du cerveau mais il est possible de le détecter dans différents tissus, comme le tissu myocardique, rénal, pulmonaire, musculaire, pancréatique ou testiculaire (3). Son transcrit primaire est composé de 16 exons numérotés de -1 à 14. Les exons 1,4,5,7,9,11,12,13 sont constitutifs (4). L'expression des exons 4 et 8 n'est pas retrouvée dans le cerveau humain, ils n'y sont donc pas traduits. L'exon 6 y est présent de façon minoritaire et conduit à l'expression d'une protéine Tau tronquée en C-terminal (5). Les exons -1 et 14 sont transcrits mais pas traduits car ils sont situés respectivement dans la séquence promotrice ou dans la région 3' du gène qui est non traduite. Un épissage alternatif des exons 2,3 et 10 a lieu dans le cerveau humain (3) ce qui produit six isoformes différentes de la protéine tau : 2-3-10- ; 2+3-10- ; 2+3+10- ; 2-3-10+ ; 2+3-10+ ; 2+3+10+ (4). Parmi ces six isoformes, trois possèdent trois domaines répétés en C-terminal : les 3R. Les trois autres isoformes possèdent quatre domaines répétés : les 4R (Figure 1)

Au cours du développement, l'expression de la protéine tau est régulée : une seule isoforme est présente à la naissance (sans les exons 2,3 et 10), puis plusieurs autres isoformes apparaissent

chez l'adulte avec des séquences d'acides aminés de longueur variable, comme représenté sur la Figure 1.

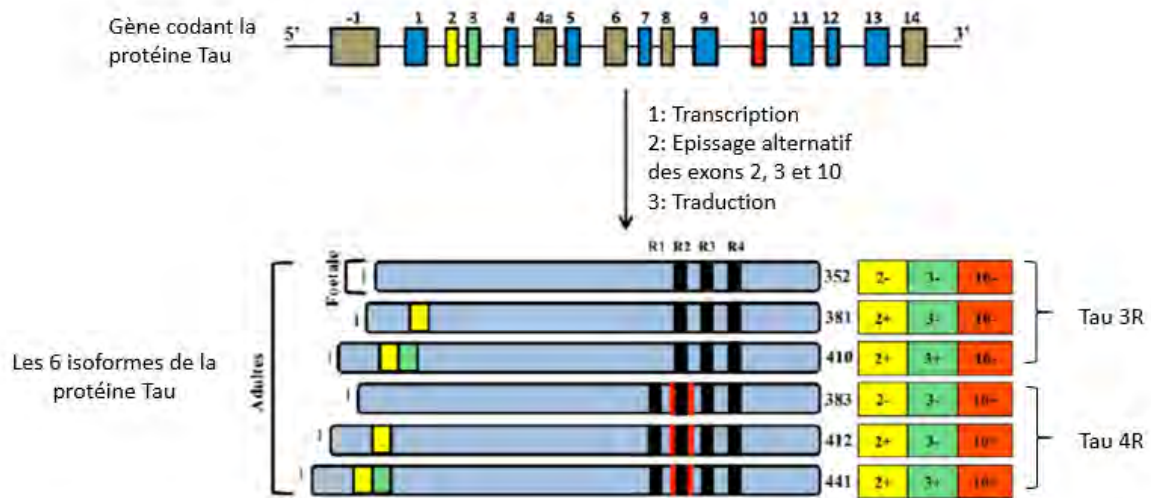


Figure 1 : Représentation schématique du gène de la protéine Tau et de ses 6 isoformes

Source : Adaptée de Buée et al. (6)

I.2 Structure de la protéine tau

Tau est une protéine hydrophile et linéaire dont la taille de ses six isoformes varie entre 352 et 441 acides aminés (4).

D'un point de vue structural, cette protéine est organisée en plusieurs régions avec des propriétés physico-chimiques différentes comme il est possible de le voir sur la Figure 2:

- Le domaine N-terminal est composé d'une extrémité très acide et d'un domaine riche en proline. Il est appelé domaine de projection et permet l'interaction avec des éléments du cytosquelette et de la membrane plasmique en se situant à la surface du microtubule. Il détermine la distance entre le microtubule et l'axone, ceci étant la cause de répulsion électrostatique de par la charge négative des microtubules et de l'axone.
- Le domaine C-terminal est composé de motifs répétés codés par les exons 9 à 12 et correspond au domaine de liaison aux microtubules. Il contient 3 à 4 séquences de 18 acides aminés hautement similaires. Ces motifs sont présents au nombre de 3 ou 4 (R1 à R4) selon l'inclusion de l'exon 10 qui détermine la présence du domaine R2. Les 3 isoformes qui ne possèdent pas l'exon 10 (10-) dans leur séquence de liaison aux microtubules sont constituées de 3 domaines de répétition : Tau 3R. Les 3 autres isoformes possèdent l'exon 10 (10+) et sont donc Tau 4R. Ce quatrième domaine

modifie l'affinité de Tau pour les microtubules : les isoformes Tau 4R ont une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes 3R (7). En effet, l'interaction avec la tubuline est plus forte avec ce quatrième domaine ce qui permet une stabilisation des microtubules et une modulation de la longueur des extensions neurotiques et de la plasticité neuronale. Ainsi, les domaines répétés de la protéine tau permettent la stabilisation du cytosquelette neuronal par liaison aux microtubules, à la spectrine et à l'actine (8).

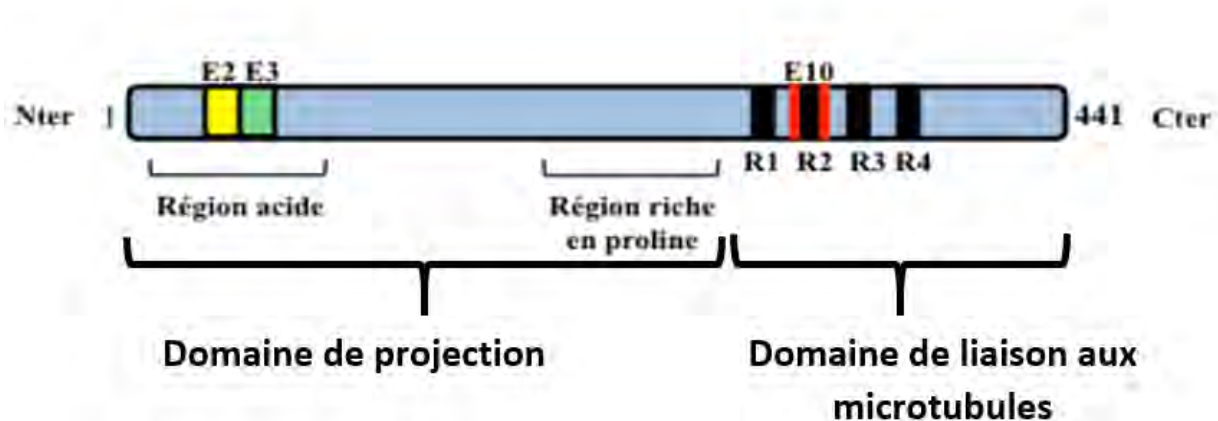


Figure 2 : Exemple de l'isoforme la plus grand de 441 AA de la protéine Tau

Source : Adaptée de Buée et al., 2000 (6)

I.3 Fonctions de la protéine tau

La protéine tau est retrouvée chez de nombreuses espèces animales et chez l'humain, principalement en intracellulaire dans les axones des neurones. Elle peut également être présente au niveau synaptique, nucléaire ou membranaire. Selon son emplacement, tau jouera un rôle différent adapté à sa localisation (6).

I.3.1 Localisation cytosolique

I.3.1.1 Dynamique des microtubules

Le cytosquelette neuronal est constitué des microtubules, des filaments d'actine et des neurofilaments. Dans les axones la fonction principale de Tau est sa liaison aux microtubules. Elle dépend de l'organisation des microtubules et des filaments d'actine. Si le neurone est déficient en actine ou en tau, sa croissance est stoppée au niveau du cône de croissance (9).

Les protéines tau permettent une régulation de la stabilité des microtubules selon leur état de phosphorylation : une phosphorylation anormale de tau entraîne le désassemblage des microtubules, le blocage du transport des vésicules et provoque le processus de DNF. Sous forme déphosphorylée, Tau se lie aux microtubules ce qui permet leur polymérisation. (6)

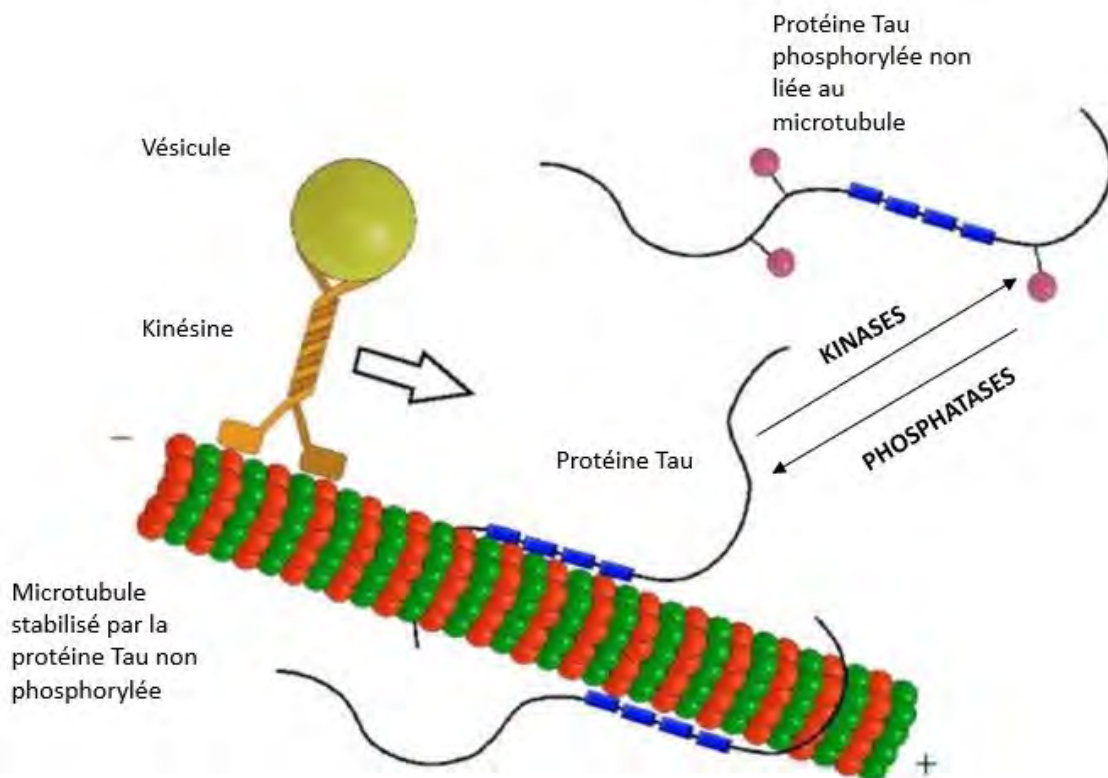


Figure 3 : Phosphorylation de Tau et dynamique microtubulaire

Source : Adaptée de Kolarova et al., 2012 (10)

L'efficacité de liaison de la protéine Tau aux microtubules est également régulée par le nombre de domaines de répétition. Les isoformes de Tau avec quatre domaines de répétitions ont une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes en contenant trois.

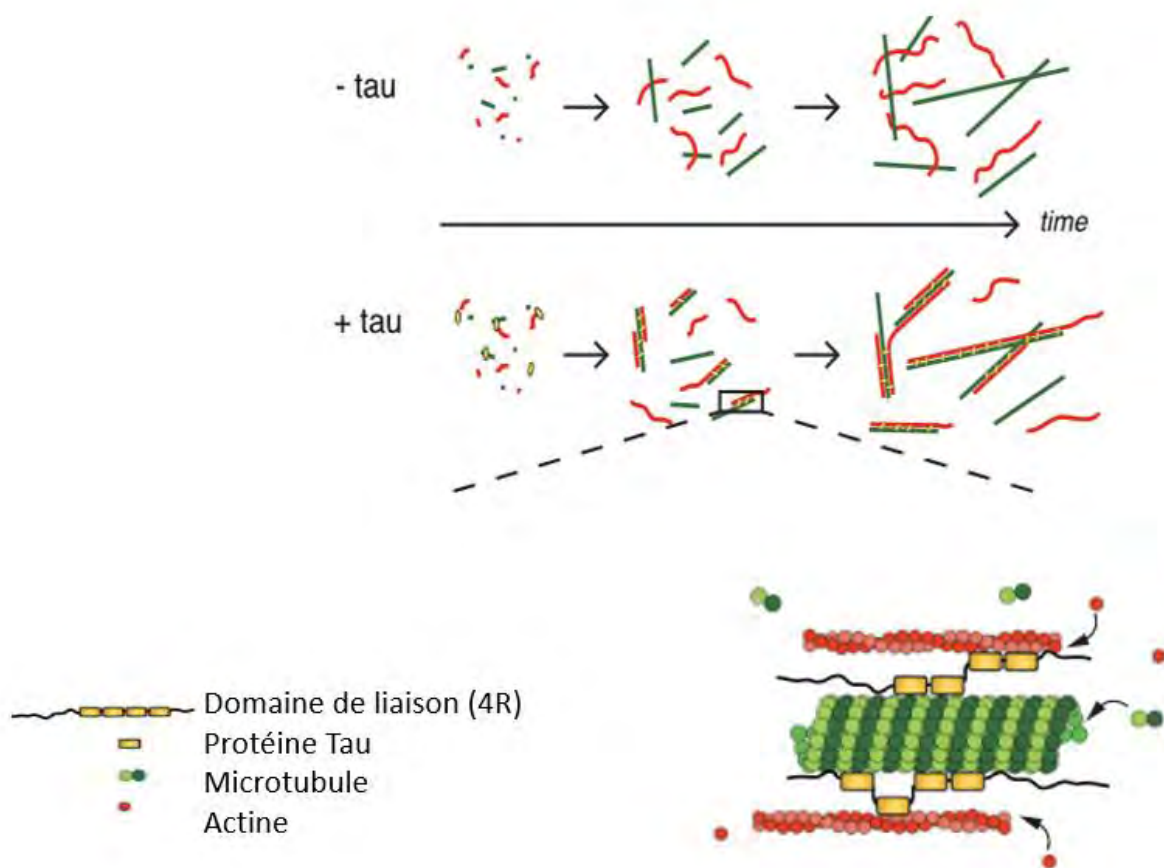


Figure 4 : Rôle de la protéine tau dans la stabilisation du cytosquelette par liaison aux microtubules et à l'actine

Source : Adaptée de Elie et al., 2015 (11)

I.3.1.2 Transport axonal

Les microtubules sont des structures polarisées, la polymérisation se fait à l'extrémité positive et la dépolymérisation à l'extrémité négative. Des protéines motrices, les kinésines ou dynéines, permettent le transport intracellulaire de protéines, vésicules et organites. La kinésine assure le transport antérograde du corps du neurone vers les terminaisons nerveuses (extrémité positive). La dynéine permet le transport rétrograde de la synapse vers le noyau. La protéine Tau stabilise les microtubules ce qui assure le bon fonctionnement des mécanismes de transport. (8) Elle peut également interagir avec les protéines motrices et perturber le transport axonal.

Cependant, le rôle de tau dans le transport axonal semble complexe. En effet, en condition physiologique, la liaison de tau aux microtubules ne semble pas modifier le transport axonal (12).

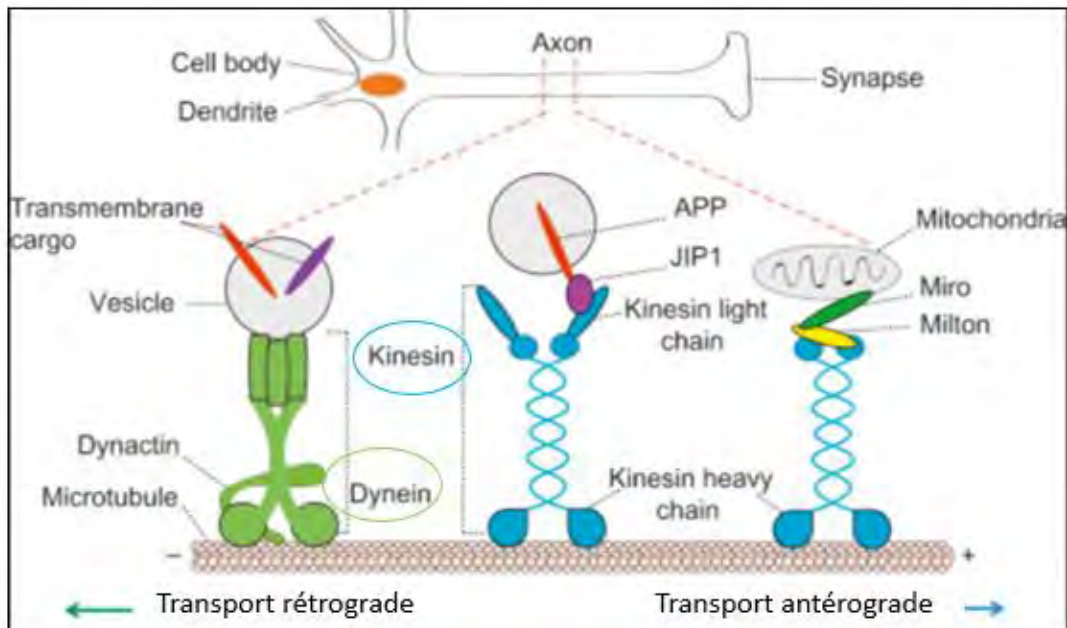


Figure 5 : Le transport axonal

Source : Adaptée de Lawrence and al., 2018 (13)

I.3.2 Localisation à la membrane plasmique

Le domaine de projection de la protéine tau peut interagir avec la membrane plasmique. La région riche en proline du domaine de projection (Figure 2) se lie avec le domaine SH3 des protéines kinases de la famille Src localisées dans les radeaux lipidiques. La protéine Fyn (de la famille des Src) phosphoryle les récepteurs NMDA sur une de ses sous-unités ce qui joue un rôle dans la transduction du signal, en modulant l'activité de ce récepteur impliqué dans les phénomènes mnésiques. (14)

I.3.3 Localisation nucléaire

Le rôle de la protéine tau au niveau nucléaire reste encore peu connu. Cependant, elle semble jouer un rôle dans l'organisation du nucléole et la protection de l'ADN (15). La liaison de la protéine tau à l'ADN se fait probablement grâce au domaine de liaison aux microtubules ou à la région riche en proline (16).

Tableau 1 : Fonctions de la protéine tau selon sa localisation

Localisation de la protéine tau	Membrane plasmique	Cytosol	Noyau
Fonctions	Régulation des voies de signalisation	Assemblage et stabilisation des microtubules Polarité axonale Transport axonal	Organisation du nucléole Protection de l'ADN neuronal

I.4 Modifications post-traductionnelles de la protéine tau

Il existe deux types de modification post-traductionnelle majoritaire de la protéine tau : la phosphorylation et la glycosylation. Les autres types de modifications qui existent sont le clivage, la polyamination, la sumoylation, la glycation, l'acétylation, la nitration (17). Ces dernières sont moins nombreuses car beaucoup moins de sites sont susceptibles de recevoir ces modifications.

I.4.1 La phosphorylation

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle : il existe 85 sites potentiels de phosphorylation de la protéine Tau. Elle dépend de l'équilibre entre l'activité de deux enzymes antagonistes : les phosphatases (déphosphorylation) et les kinases (phosphorylation). (6)

I.4.1.1 Phosphorylation par des kinases

Les protéines tau sont majoritairement phosphorylées sur les résidus Sérine et Thréonine par deux groupes de kinases :

- Les kinases du groupe PDPK (proline-directed protein kinases) qui phosphorylent sur des résidus sérine et thréonine qui suivent des résidus proline : la MAPK (Mitogen activated protein kinase), la GSK3 (Glycogène synthétase 3-β), les CDK5 et CDK2 (cyclines dependent kinase), la SAP (Stress activating protein)
- Les kinases non PDPK (non proline-directed protein kinase): la PKA (cyclin AMP-dependent protein kinase), la CaMKII (Calcium and calmoduline dependent protein

kinase II), la CKI et la CKII (Casein kinase), la MARK (microtubule affinity regulating kinase), la PKC (protéine kinase C).

La protéine Tau peut également être phosphorylée sur des résidus Tyrosine par des protéines de la famille des Scr comme la Fyn kinase, la Lck et la kinase abelson (c-abl).

La phosphorylation permet à la protéine tau de réguler la polymérisation des microtubules en se liant à la tubuline par des séquences répétitives Pro-Gly-Gly-Gly. Tous les sites de phosphorylation sont situés hors du domaine de liaison des microtubules sauf Ser 262, 285, 305, 324,352 et 356.

Dans la majorité des tauopathies, une hyperphosphorylation des résidus serine et thréonine est présente : cela suggère que c'est une forme prédisposante à l'agrégation de la protéine tau (17). Chez les patients présentant la MA, les résidus phosphorylés sur les tyrosine sont plus fréquents dans les agrégats de tau intracellulaire (18).

Selon le type d'isoforme, la phosphorylation module les propriétés de la protéine tau qui va elle-même moduler les propriétés d'assemblage du microtubule : rigidité, stabilité, longueur, capacité d'interaction. La protéine tau joue ainsi un rôle dans l'organisation fonctionnelle du neurone en modulant sa croissance, sa polarité et sa morphologie axonale.

Si la phosphorylation est effectuée sur la région riche en Proline en amont des motifs répétés, cela entraîne une diminution de l'affinité de Tau pour les microtubules et une dépolymérisation.

Il existe deux types de phosphorylation décrits sur la protéine Tau :

- L'hyperphosphorylation qui est située au niveau d'épitopes physiologiques, reconnue par les Anticorps AD2, AT8, AT180, AT270, 12E8.
- La phosphorylation anormale qui se fait au niveau de sites qui physiologiquement ne sont pas phosphorylés et sont reconnus entre-autre par les Anticorps AT100, TG-3 et AP422.

I.4.1.2 Déphosphorylation par des phosphatases

Les principales serine/thréonine phosphatases présentes dans le cerveau humain peuvent déphosphoryler la protéine tau sauf la protéine phosphatase 2C (PP-2C). La protéine phosphatase 2A (PP-2A) est la phosphatase majoritaire pour la déphosphorylation de Tau

(19)(20). L'inhibition de cette phosphatase entraîne une hyperphosphorylation de tau ce qui diminue sa capacité à se lier et à promouvoir l'assemblage des microtubules (21). Les contributions relatives des protéines phosphatases 2A, 1, 5 et 2B sont respectivement 71, 11, 10 et 7%.

I.4.1.3 Acteurs indirects de la phosphorylation

La phosphorylation de la protéine tau peut également être modulée par la peptidyl-prolyl cis/trans isomérase Pin1. Cette dernière entraîne l'activation de la PP2A qui déphosphoryle la protéine tau.

I.4.2 La O-glycosylation

La O-glycosylation est l'ajout de N-acétyl-glucosamine (O-GlcNAc) sur les résidus hydroxyle (-OH) de la serine ou thréonine des protéines tau.

Il semble exister une balance entre la O-glycosylation et la phosphorylation : la glycosylation antagonise la phosphorylation de tau. La forme O-GlcNAc semble être protectrice d'une hyperphosphorylation et de l'agrégation mais ne peut être présente que si le métabolisme glucidique neuronal est normal. (22). Chez les patients atteints de la MA, un fort déficit en forme O-GlcNAc de la protéine tau est observé (23).

La O-glycosylation de tau pourrait également jouer un rôle dans son interaction avec la tubuline agissant ainsi sur la localisation subcellulaire et la dégradation de Tau (24)

I.4.3 Autres modifications post-traductionnelles

En condition physiologique, les autres modifications post-traductionnelles de la protéine tau comme la N-glycosylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la nitration, la polyamination et la protéolyse restent limitées. Dans la MA, une augmentation de ces modifications est souvent observée. Les effets de ces modifications sur la protéine Tau sont mal connus, mais en comparaison à la phosphorylation, il existe beaucoup moins de sites susceptibles de recevoir ces modifications.

I.5 Agrégation pathologique de la protéine tau

Les différentes études faites in vitro ont pu montrer l'existence de trois phases dans le processus d'agrégation pathologique de la protéine tau (Figure 6) :

- La première phase est la nucléation (dimérisation) : un pont disulfure intermoléculaire forme un dimère (25). Cela constitue le noyau à partir duquel l'élongation des fibres va se faire. (B sur la Figure 6)
- La seconde phase est l'élongation : les protéines tau monomériques se fixent sur les dimères provoquant la croissance de l'oligomère par empilement. La thioflavine S permet de détecter par des techniques de fluorescence la vitesse d'élongation des fibres ce qui permet de supposer la structure en feuillets β des oligomères (26) (C sur la Figure 6).
- La troisième phase (D sur la Figure 6) est un assemblage des oligomères en fibrilles qui forment des PHF (Paire de Filaments hélicoïdaux) en s'accumulant (27).

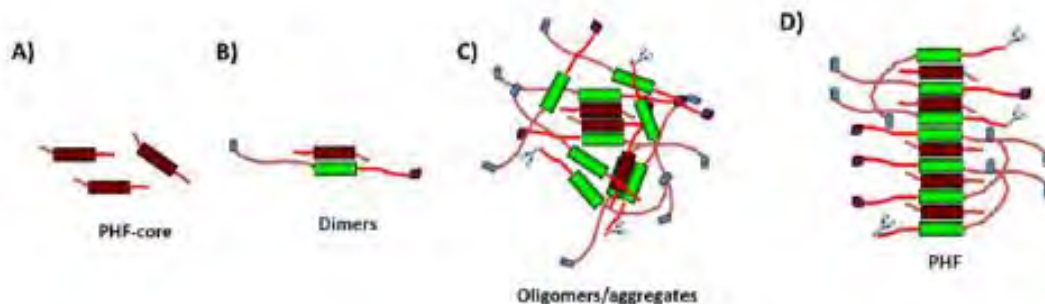


Figure 6 : Agrégation de la protéine tau

Source : Adaptée de Luna-Munoz., 2012 (28)

L'agrégation de la protéine tau est due à des interactions anormales entre protéines qui entraînent un mauvais repliement de la protéine. Lorsque ces protéines sont incorrectement repliées il existe trois systèmes de dégradation : les chaperonnes (29), le protéasome ou l'agrégation (30).

Des études biochimiques ont permis de mettre en évidence une altération de la phosphorylation de la protéine Tau dans les agrégats : les protéines Tau des agrégats sont hyperphosphorylées (31)

L'hyperphosphorylation de la protéine tau correspond à un épitope qui va être reconnu par de nombreux anticorps dirigés contre les sites de phosphorylation comme l'illustre la Figure 7. Certains sites de phosphorylation sont présents sur des protéines Tau dites « normales » et reconnus par des anticorps dépendant de la phosphorylation : AD2, AT8, AT180, AT270 et 12E8. D'autres sont dits « pathologiques » car anormalement phosphorylés ou phosphorylés sur des protéines Tau agrégées. Ils sont reconnus par les anticorps AT100, PHF-27/TC-3 et AP422/988.

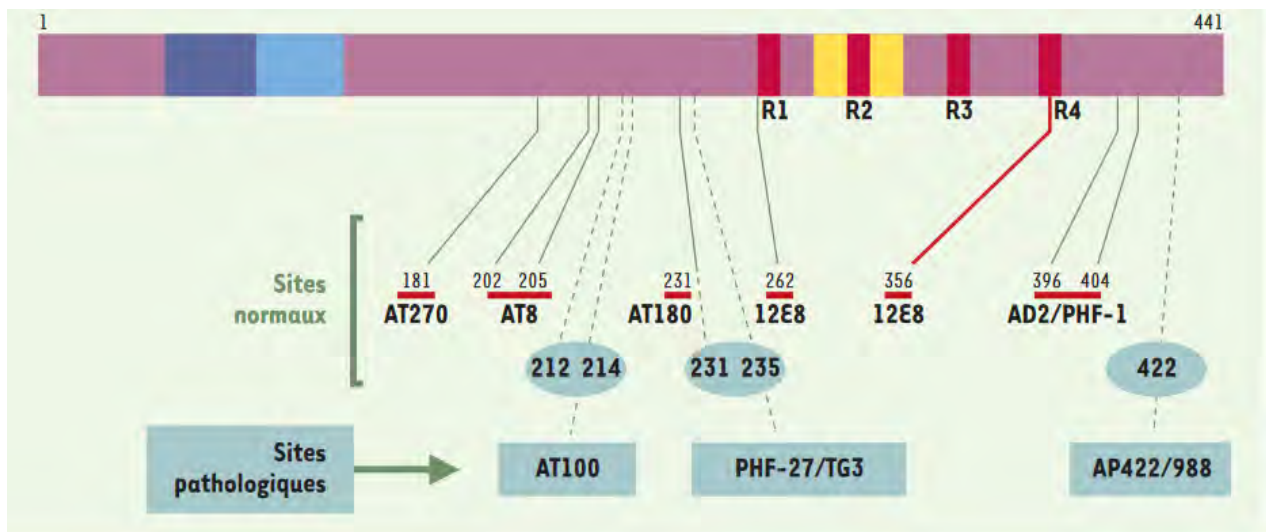


Figure 7 : Phosphorylation de la protéine Tau : physiologique et pathologique

Source : Adaptée de Buée et Delacourte, 2002 (32)

Dans les neurones, un équilibre entre des formes de la protéine tau peu phosphorylées et les formes phosphorylées permet d'assurer la dynamique des microtubules. Lorsque le neurone est en état de DNF avec des PHF, il y a une hyperphosphorylation ou une phosphorylation anormale des six isoformes de tau. Selon les états de phosphorylation de la protéine tau (apparition de nouveaux épitopes), l'immunoréactivité des anticorps décrits diffère. (Figure 8)

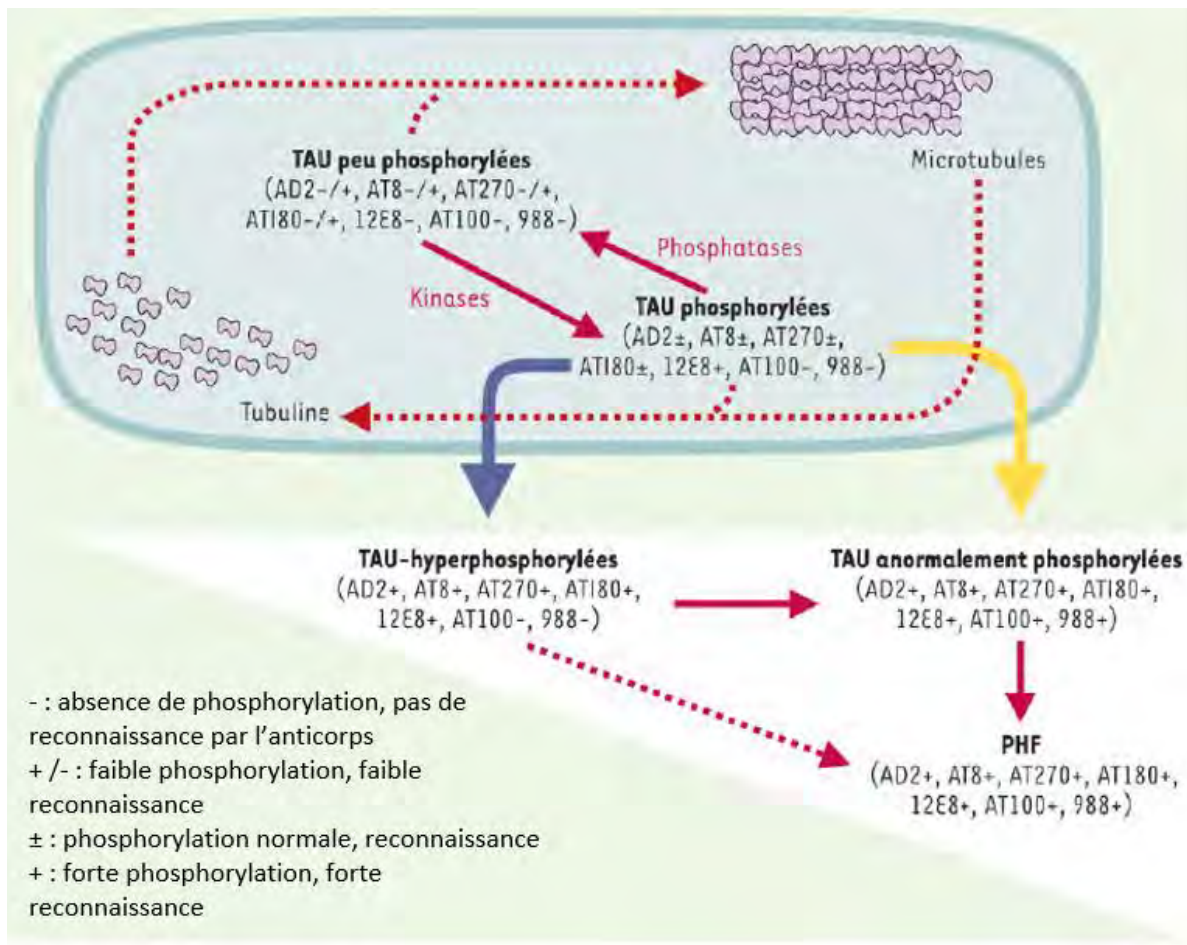


Figure 8 : Phosphorylation de la protéine tau et immunoréactivité aux anticorps

Source : Adaptée de Buée et Delacourte., 2002 (32)

I.6 Toxicité de la protéine tau

L'hyperphosphorylation de tau et la séquestration de la protéine Tau soluble dans les PHF conduit à son détachement des microtubules et entraîne leur fragilisation. Cela conduit à une altération du cytosquelette microtubulaire causant un défaut de structure de la cellule neuronale et un défaut du transport axonal (33). En effet, la phosphorylation d'un seul épitope de la protéine tau suffit à altérer la stabilité des microtubules. C'est le cas si la phosphorylation a lieu sur un résidu serine 262, 214 ou thréonine 231. Il a alors été observé une diminution de la capacité de la protéine tau à stabiliser le réseau des microtubules, par une altération de sa liaison.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la toxicité dans la MA suggère qu'un excès de protéine tau est présent sur les microtubules car il existe une diminution des mécanismes de dégradation (Figure 9). Cela altère le transport axonal kinésine dépendant (mitochondries, peroxysomes), ce qui provoque une altération du fonctionnement synaptique et une mort neuronale.(34)

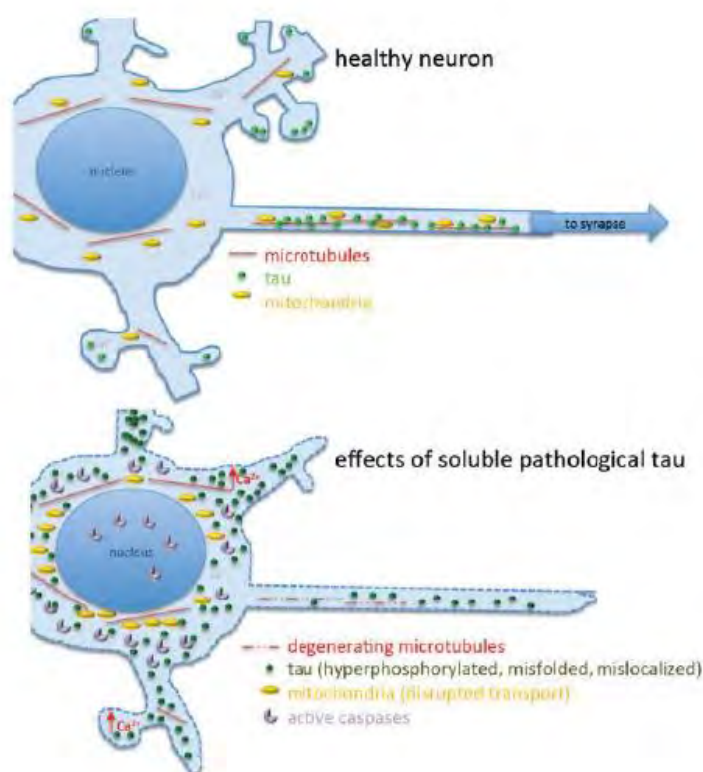


Figure 9 : Dégénérescence neuronale par excès de protéine tau soluble et sous forme d'oligomère.
 Source : Adaptée de Kopeikina et al., 2012 (34)

I.7 Hypothèse de la propagation selon un mécanisme de type prion

La présence d'oligomères de protéine tau (agrégation primaire) semble être un facteur favorisant l'agrégation de nouvelles protéines tau qui se transmet ensuite de cellules en cellules dans les neurones du cerveau par un mécanisme prion-like (35).

Ce modèle permettrait d'expliquer la progression irréversible et inévitable de la maladie vers la démence une fois le processus neurodégénératif initié. Sur de récentes études, l'injection de protéine tau mutée à des souris transgéniques avec Tau humain non muté, a induit l'agrégation de la protéine Tau humaine non mutée et sa propagation aux régions voisines du site d'injection. (36)

I.8 La Maladie d'Alzheimer

La MA a été décrite pour la première fois en 1906 par un médecin allemand Aloïs Alzheimer qui l'a diagnostiqué chez une de ses patientes.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 50 millions de personnes sont atteintes de démences dans le monde parmi lesquelles 60 à 70% sont atteintes de la maladie d'Alzheimer. Selon le rapport de l'Alzheimer's Disease International (ADI) de 2015 (37), le nombre de cas de démence va presque doubler tous les 20 ans.

Du fait de l'allongement de l'espérance de vie, le nombre de patients atteints de la MA devrait continuer à augmenter au cours des prochaines années.

Elle se déclare dans la majorité des cas à partir de 65 ans et les premiers symptômes sont les troubles de la mémoire, avant l'apparition de troubles du langage et du comportement. Dans certaines formes héréditaires rares, les symptômes peuvent apparaître à partir de 40 ans.

L'imagerie moléculaire que nous étudierons dans la partie suivante a permis de montrer que les lésions apparaissent 15 à 20 ans avant les premiers symptômes. Cela s'explique par une plasticité neuronale importante : c'est le phénomène de compensation permettant à une région endommagée d'être relayée par une autre.

A l'heure actuelle, cette maladie est incurable, il existe des traitements symptomatiques efficaces uniquement au début de la maladie. La difficulté est l'apparition tardive des symptômes à un stade où les lésions sont irréversibles.

I.8.1 Physiopathologie

On observe deux types de lésions caractéristiques dans le cerveau des patients atteints de la MA (Figure 10) :

- Des plaques amyloïdes, ou plaques séniles : elles sont constituées d'agrégats de peptide bêta-amyloïde présents entre les neurones.
- Une dégénérescence neurofibrillaire : c'est l'accumulation, sous forme de fibres, à l'intérieur des neurones, au niveau de la substance grise du néocortex d'une protéine anormale, la protéine Tau (Tau –PHF).

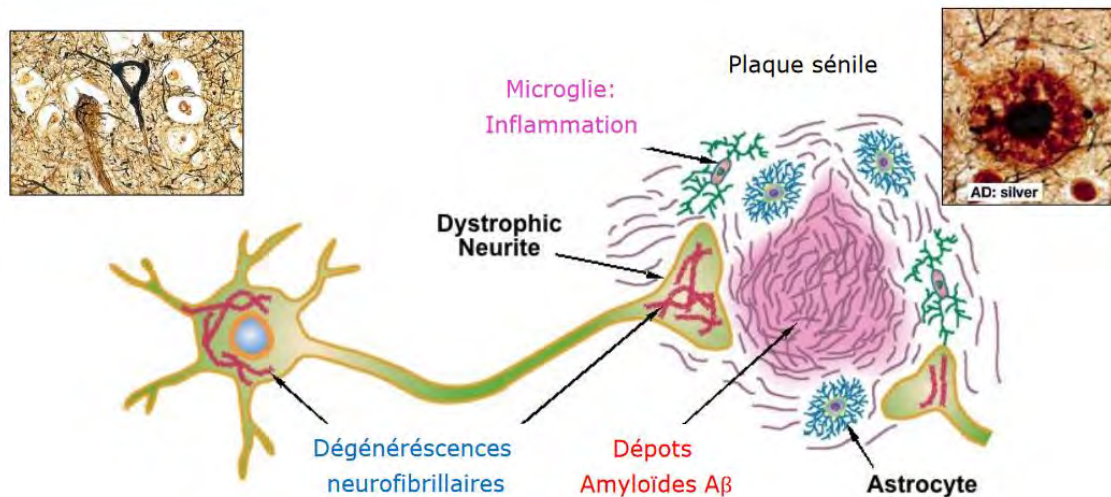


Figure 10 : Les lésions caractéristiques de la MA

I.8.2 Les plaques séniles

C'est une des lésions histopathologiques clés de la MA : ce sont des lésions extracellulaires composées d'un dépôt de peptide β -amyloïde qui dérive d'une protéine précurseur nommée APP. Ce dépôt existe dans la paroi des veines, artères et capillaires méningés ou parenchymateux constituant l'angiopathie amyloïde. Au niveau cérébral, le dépôt des agrégats de peptide β -amyloïde commence dans le cortex et le néocortex cérébral, puis s'étend ensuite aux régions trans entorhinales et entorhinales, à l'hippocampe, au diencephale et pour finir au niveau du tronc cérébral. (38)

En microscopie, les dépôts amyloïdes observés ont une taille de 10 à 20 μ m de diamètre pouvant être colorés par du rouge Congo ou de la thioflavine. C'est leur structure chimique caractéristique en feuillet β qui les rend insolubles. (39) (40)

Il existe deux voies essentielles de métabolisation de l'APP (protéine transmembranaire, dont le gène est localisé sur le chromosome 21) schématisées sur la Figure 11 (41) :

- La voie non-amyloïdogénique, où l'APP est clivé par l' α -sécrétase et cela conduit à la formation de peptide soluble sAPP α et C83.
- La voie amyloïdogénique qui, suite à l'action de deux sécrétases (β -sécrétases nommées BACE1 et la γ -sécrétase), conduit au peptide β -amyloïde composé de 40 à 42 acides aminés.

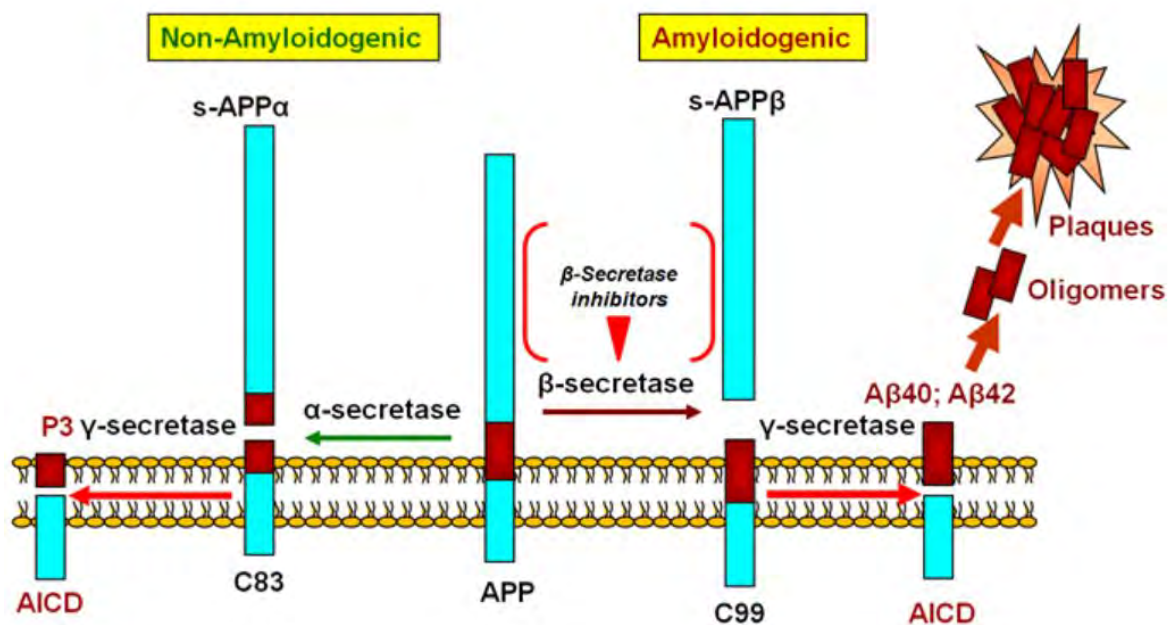


Figure 11 : Les voies de métabolisation de l'APP

Source : Zhang., 2012 (41)

Les formes majoritaires du peptide A β sont les A β 1-40 et A β 1-42 comptant pour 90% et 10% des formes totales. La particularité du peptide A β 1-42 est la présence de deux acides aminés hydrophobes supplémentaires ce qui lui confère un potentiel pro-agrégatif plus important que la forme A β 1-40.

Dans la MA, nous observons une augmentation de la quantité de peptide β -amyloïde dans le cerveau de part une augmentation de la production de monomères de peptide β -amyloïde et l'altération de leur clairance en périphérie. (42). Cette augmentation de concentration conduit à la formation d'agrégats solubles sous forme d'oligomères, formés d'une dizaine de monomères, puis une agrégation en protofibrilles de moins en moins soluble finissant par se déposer en fibrille qui est le constituant de la plaque.

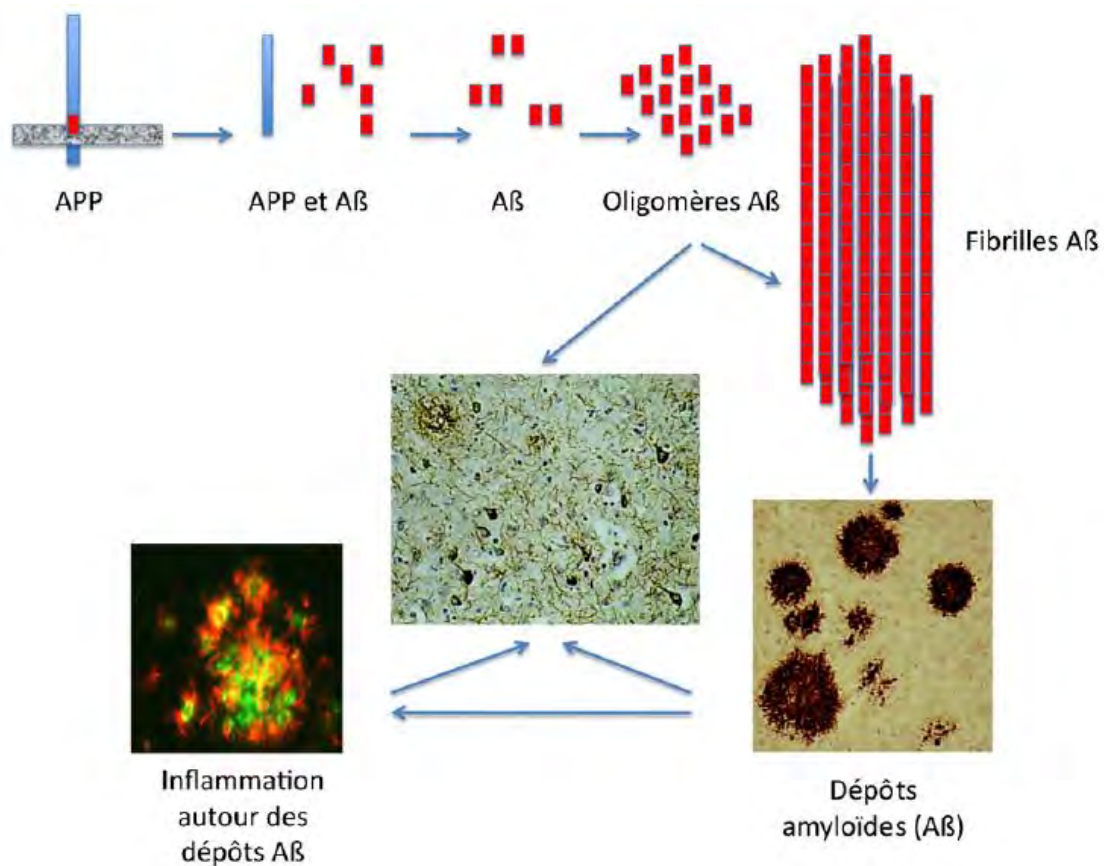


Figure 12 : Hypothèse de formation du dépôt amyloïde

Source : Adaptée de Checler et Buée., 2009 (43)

I.8.3 La dégénérescence neurofibrillaire

La DNF est une accumulation de protéine Tau intra neuronale sous la forme de filaments appariés en hélice, les PHF.

Toutes les personnes de plus de 50 ans présentent de la DNF, mais son accumulation se limite à la région de l'hippocampe et est moins intense que dans la maladie d'Alzheimer.

Selon le stade de la maladie d'Alzheimer, les DNF ont une densité et une distribution différente (44). La propagation de la DNF est fortement corrélée à l'évolution des signes cliniques et à la sévérité de la maladie. C'est un processus progressif se terminant par un envahissement du cortex cérébral qui pourrait expliquer le déclin cognitif.

En 1991, six stades ont été distingués en corrélation avec les dysfonctionnements cognitifs grâce à des analyses post-mortem sur des cerveaux de patients (Braak and Braak, 1991) :

- Stade I : la DNF se situe dans la région trans-entorhinale (entre le cortex entorhinal et l'isocortex temporal adjacent)

- Stade II : la DNF envahit la couche II du cortex entorhinal et le secteur CA1 de l'hippocampe
- Stade III : la DNF augmente dans les régions déjà touchées et envahit le néocortex temporal adjacent
- Stade IV : la DNF s'étend au subiculum
- Stade V : la DNF apparait dans le néocortex associatif. C'est à partir de ce stade que la démence se manifeste.
- Stade VI : la DNF se développe dans le néocortex sensoriel et moteur

Cette classification de Braak and Braak est toujours à l'heure actuelle la référence qui est utilisée par les médecins.

Une autre classification en dix stades selon la propagation de la protéine Tau a été proposé par Delacourte et al en 1999 (Figure 13). Elle transcrit une progression de la protéine Tau de manière stéréotypée, séquentielle et hiérarchique dans les différentes régions du cerveau. Au stades S0 à S5 les cerveaux des patients sont non-déments et aux stades S7 à S10, les patients étaient atteints de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, une forte corrélation est observée entre la DNF et les perturbations mnésiques.

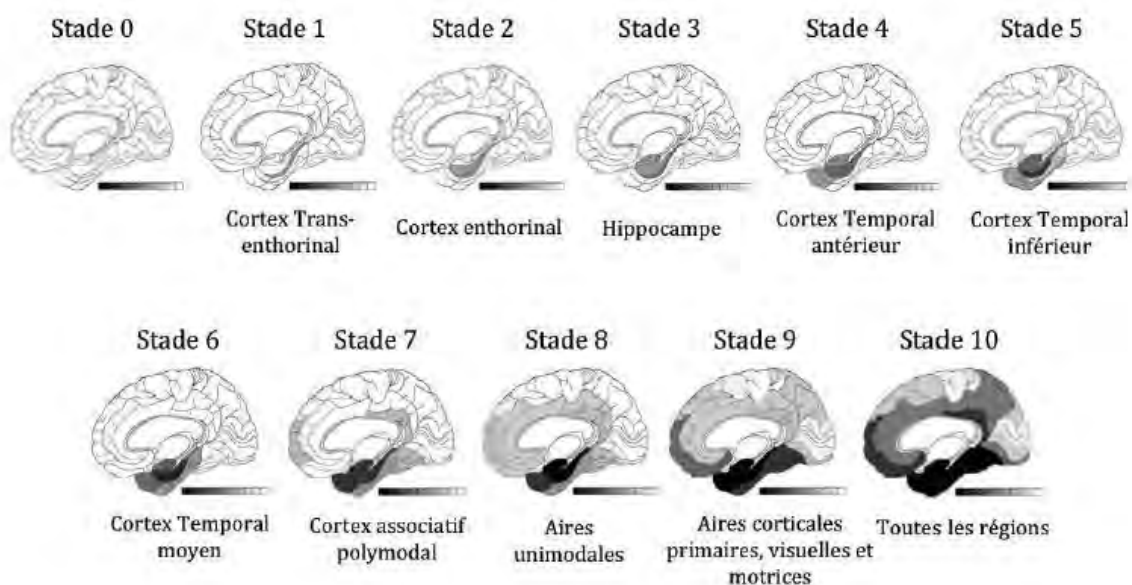


Figure 13 : Progression de la DNF au cours de la MA

I.8.4 L'inflammation

La neuroinflammation est une réponse inflammatoire adaptative au sein du système nerveux central. Elle dépend de plusieurs processus médiés par des cellules neuronales comme les astrocytes, et par des cellules non neuronales telles que les macrophages et les microglies du cerveau. Au cours des processus inflammatoires, les cytokines, les chimiokines et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par les cellules gliales.

Les dépôts amyloïdes et la DNF participent à l'inflammation chronique présente dans la maladie d'Alzheimer en activant la microglie. Dans les stades précoces de la MA, l'activation de la microglie semble jouer un rôle protecteur sur l'évolution clinique. En effet, la microglie activée est capable de phagocytose des dépôts amyloïdes *in vitro* (45). D'autre part, la TSPO (protéine hydrophobe située dans la membrane mitochondriale externe) est absente du parenchyme cérébral sain, mais identifiée dans les cellules microgliales activées de patients atteints de la MA. Une corrélation positive a été démontrée entre la surexpression de la TSPO et le score MMSE (Mini Mental Score Examination) : la surexpression de cette protéine ralentirait la dégradation de l'état clinique. (46)

Cependant, cette activité de phagocytose est diminuée par les médiateurs inflammatoires tels que la cytokine TNF α , les chimiokines CCL3, CCL4, CCL5, dont l'expression locale peut être néfaste pour les neurones. La microglie activée exerce alors dans ce cas, un effet protecteur moindre.

I.8.5 Les différentes hypothèses sur les origines moléculaires de la MA

L'origine de la maladie étant encore inconnue à ce jour, plusieurs hypothèses ont été faites :

- la cascade amyloïde de Hardy (47) est la plus connue : A β est l'élément neurotoxique déclenchant les mécanismes d'excitotoxicité par les récepteurs NMDA. Ces derniers entraînent une phosphorylation anormale de tau menant à la formation de PHF. Parmi les métabolites de l'APP, le fragment N-terminal sécrète sAPP α qui possède des fonctions neurotrophiques et le fragment intracellulaire AICD qui est un facteur de transcription. (48)

- la présence du peptide « éta-amyloïde » autour des plaques séniles : comme le peptide bêta-amyloïde, il semble toxique pour les neurones mais son rôle dans la maladie n'a pas encore été compris (49).
- la réaction inflammatoire des cellules immunitaires autour de la plaque amyloïde : elle apparaît très précocement, avant les signes cliniques, et joue un rôle protecteur sur son apparition. En revanche, cela n'exclut pas que l'inflammation puisse être néfaste à des stades avancés de la MA (46).
- la diminution de l'apport sanguin cérébral comme premier signe détectable dans la MA avant même l'augmentation du peptide amyloïde (50).
- l'accumulation cérébrale de tau serait directement corrélée à l'apparition des symptômes selon une étude réalisée grâce à l'imagerie moléculaire (51). En 2018, une nouvelle étude explique comment tau pourrait être à l'origine de la MA : le contact d'une protéine tau normale avec un protéine tau anormale sous forme de fibre provoquerait sa conversion en forme anormale selon une propagation de proche en proche (théorie du Prion que nous avons cité précédemment)(52).
- le peptide bêta-amyloïde pourrait faire partie des mécanismes de réponse immunitaire innés en première ligne de défense de l'organisme contre une infection. Ainsi selon cette hypothèse, l'amylose serait la conséquence d'une agression et non une cause. Son activité antimicrobienne a été montrée dans le cerveau d'animaux infectés par une bactérie et *in vitro* sur des cellules humaines (53). Une autre équipe américaine centrée sur la même hypothèse a montré chez la souris que les peptides bêta-amyloïdes étaient capables de « piéger » les virus de l'herpès dans le cerveau : l'animal est ainsi protégé de l'inflammation cérébrale provoquée par les virus. A l'opposé, l'inflammation chronique accélère aussi le dépôt des peptides amyloïdes ce qui accélère le développement de la maladie d'Alzheimer (54).
- la découverte du gène BMI1 qui a l'état inactivé peut-être à l'origine du déclenchement de la MA chez les personnes de plus de 65 ans. Ainsi, restaurer l'activité de ce gène pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante (55).

- Le fonctionnement des mitochondries neuronales semble perturbé avant l'apparition des premiers symptômes de la MA. Ce déclin énergétique semble entraîner une cascade moléculaire conduisant à la maladie. Cette altération de la production énergétique des cellules nerveuses serait amplifiée en présence du peptide bêta-amyloïde (56) (57).
- La protéine tau serait impliquée dans la réponse à l'insuline dans le cerveau. Cette réponse est indispensable à la bonne régulation et utilisation du glucose par les cellules du cerveau. Ainsi, la protéine Tau anormale induirait chez les malades une résistance à l'insuline dans le cerveau, similaire à ce qui est observé dans le diabète de type 2 au niveau des tissus du corps. La recherche se poursuit pour comprendre ce mécanisme qui pourrait mener à de nouvelles approches thérapeutiques (58).
- Le dysfonctionnement des connexions entre les neurones entrainerait la MA. Si elle se confirme, cette hypothèse pourrait remettre en cause les approches thérapeutiques de la maladie, qui visent le plus souvent à stopper la perte des connexions et non à améliorer leur fonctionnement (59).

Les progrès dans la compréhension de la physiopathologie de la MA ont permis de démontrer que les lésions sont présentes de nombreuses années avant l'apparition des symptômes de la maladie : une quinzaine d'années pour les plaques amyloïdes et une dizaine d'années pour la protéine tau.

L'imagerie moléculaire est une étape importante pour le diagnostic précoce de ces lésions de la MA, avant l'apparition des premiers symptômes.

II L'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire permet de mesurer quantitativement des processus biologiques (la captation cellulaire du glucose) ou le fonctionnement cellulaire (interaction récepteur/ligand). Des marqueurs ou sondes sont ainsi introduits dans l'organisme, dans un type cellulaire ou un organe pour être mis en évidence par imagerie.

Nous allons nous intéresser à l'imagerie moléculaire utilisant un médicament radiopharmaceutique (MRP) détecté par tomographie par émission de positon (TEP). Une

modélisation des interactions entre le médicament radiopharmaceutique (MRP) et la molécule cible présente dans l'organisme est effectuée.

II.1.1 Définition d'un médicament radiopharmaceutique

Un MRP est constitué :

- D'une molécule vectrice : vecteur, substrat, ligand ou autre permettant de cibler une fonctionnalité ou une substance à étudier
- D'un radionucléide ou isotope radioactif qui permet de localiser la distribution du vecteur au sein de l'organisme.

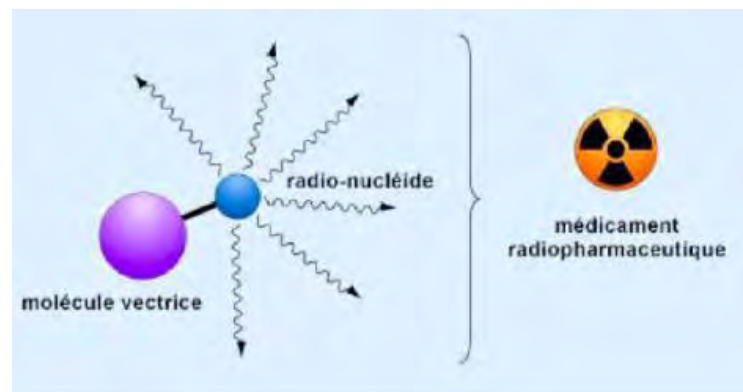


Figure 14 : Médicament radiopharmaceutique

Dans cette thèse, nous allons nous concentrer sur l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 où le vecteur est la molécule AV1451 et l'isotope radioactif le $[^{18}\text{F}]$.

II.1.2 Imagerie TEP

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

La réalisation d'un examen de TEP comprend plusieurs étapes : (Figure 15)

- La production du radioélément par un cyclotron (1). Il s'agit de radioisotope émetteur de positon avec une courte demi-vie (2) (de 2,1min pour l' $[^{15}\text{O}]$ à 109 min pour le $[^{18}\text{F}]$)
- La synthèse d'un MRP en incorporant l'isotope à son vecteur (3).

- L'injection du MRP dans une veine du patient (4)
- L'acquisition des données : la caméra enregistre la distribution dynamique de la radioactivité chez le patient (5)
- La reconstruction des images qui illustrent les concentrations du MRP dans le cerveau (6)
- Le traitement poussé des images pour produire un résultat biologique pertinent (7)

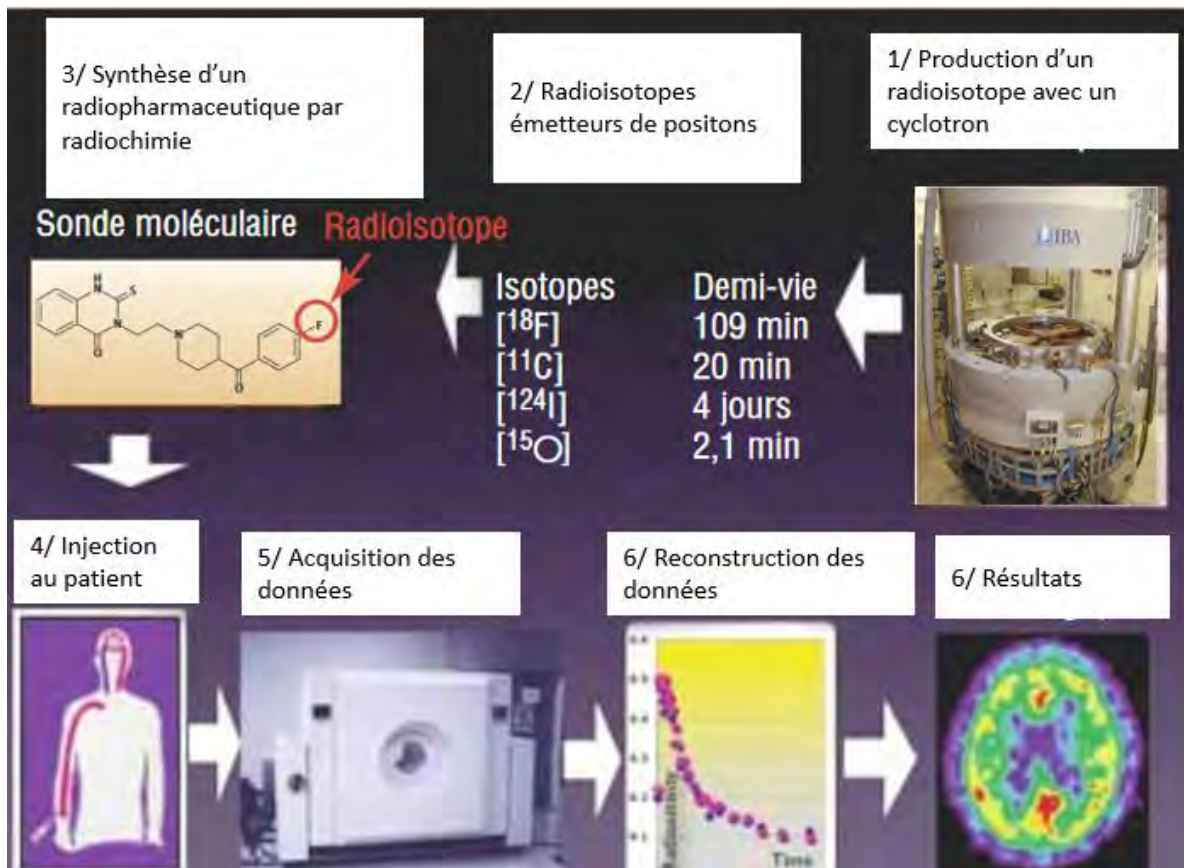


Figure 15 : Les différentes étapes de la réalisation d'un examen TEP

Source : Adaptée de Pedro Rosa-Neto (60)

II.1.2.1 La production des radioéléments utilisés en TEP : principe de fonctionnement du cyclotron

Les isotopes utilisés pour faire de l'imagerie TEP n'existent pas à l'état naturel, il faut donc les synthétiser de manière artificielle. Pour la majorité d'entre eux ce sont des produits de cyclotron. Ce dernier est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence mis au point en 1929 aux Etats-Unis par E.O. Lawrence. C'est un accélérateur de particules chargées qui va

projeter ces particules à très grande vitesse sur une cible pour engendrer une réaction nucléaire aboutissant à la création du radionucléide souhaité.



Figure 16 : cyclotron IBA du CHU de Toulouse

Pour accélérer les particules chargées, le cyclotron utilise l'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique alternatif.

De part et d'autre de la zone d'accélération, il y a des « dees » ou électro-aimants cylindriques. Au centre de ces deux héli-cylindres se situe le dispositif d'introduction des particules chargées (protons ou deutons). L'appareil est hermétiquement clos et soumis à un vide poussé afin d'empêcher l'interaction des particules introduites dans le cyclotron avec d'autres molécules.

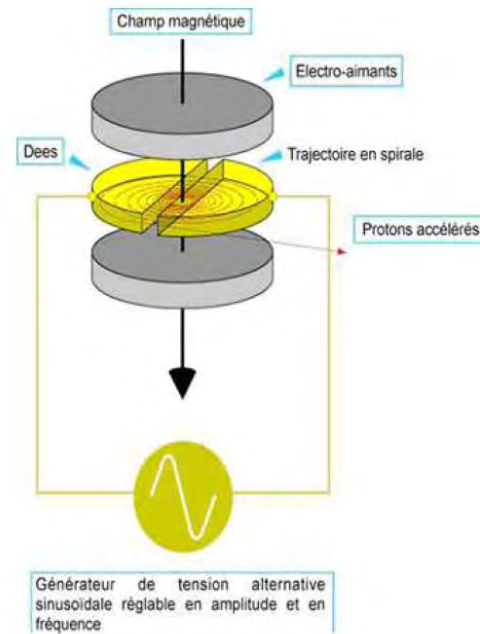


Figure 17 : Représentation schématique du fonctionnement du cyclotron

Entre les deux hémicylindres, une tension alternative est appliquée ce qui accélère les particules parallèlement à ce champ électrique. Perpendiculairement aux « dees », un champ magnétique est appliqué ce qui va courber la trajectoire initiale des particules et permettre le confinement du processus dans l'espace restreint du cyclotron.

Les particules introduites sont accélérées par le champs électrique et suivent une trajectoire circulaire sous l'influence du champ magnétique. A chaque passage entre les « dees », les particules reçoivent de l'énergie ce qui augmente leur vitesse. Les particules sont ensuite éjectées hors du cyclotron et guidées vers leur cible qui constitue un réservoir étanche contenant la substance à bombarder.

Plusieurs éléments sont fonction du radionucléide que l'on souhaite produire :

- Le choix des particules à accélérer : proton, deuton
- Le choix de la cible à bombarder
- L'intensité du courant : typiquement $37,5\mu\text{A}$
- La durée d'irradiation de la cible : classiquement 60 minutes ce qui permet d'obtenir 37GBq de $[^{18}\text{F}]$

Le radioélément d'intérêt produit peut se trouver à l'état liquide (solution d'eau enrichie pour le [^{18}F]) ou gazeux ([^{15}O]). Il est ensuite généralement transféré sous pression d'hélium vers l'entrée du module de synthèse afin de produire le MRP qui va être injecté au patient.

II.1.2.2 Emetteur de positons

Un atome radioactif émetteur de positons (particules β^+) est instable en raison d'un excès de protons et va effectuer une désintégration de type β^+ . Un de ses protons va se transformer spontanément en neutron, ce qui entraîne l'émission d'un positon et d'un neutrino. (Figure 18)

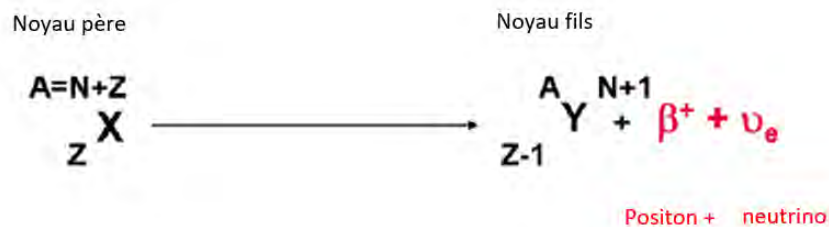


Figure 18 : Désintégration β^+

Pour qu'il y ait émission β^+ , l'énergie en excès de l'atome radioactif doit avoir pour valeur minimale 1,022MeV ce qui correspond à l'énergie libérée sous la forme des deux photons de 511keV. Les transferts d'énergie du [^{18}F], qui est le traceur TEP le plus utilisé sont symbolisés sur la Figure 19.

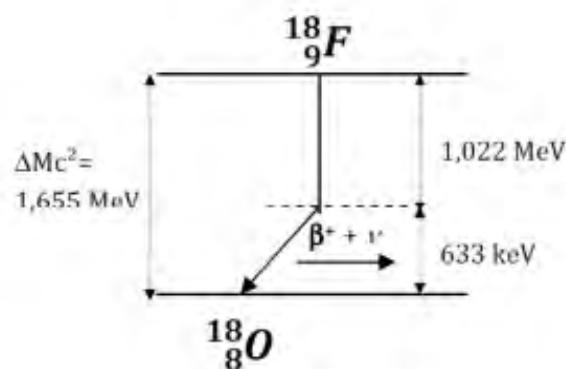


Figure 19 : Désintégration du [^{18}F]

Le positon émis va se déplacer de quelques millimètres dans les tissus et perdre son énergie cinétique. Lorsque cette énergie est nulle, il va interagir avec un électron libre de la matière entraînant alors le phénomène d'annihilation qui se caractérise par la disparition du couple

positon/électron et l'émission de deux photons γ de 511 keV dans des directions opposées à 180° . (Figure 20)

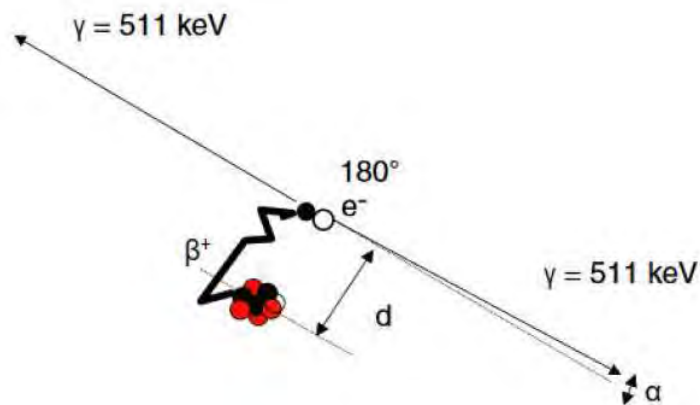


Figure 20 : Annihilation du positon avec l'émission de deux photons γ

Le principe du TEP est de détecter ces deux photons pour déterminer le lieu d'annihilation qui correspond à l'emplacement du nucléide dans le corps du patient.

II.1.2.3 Caractéristiques d'un traceur TEP : radionucléide et molécule vectrice

La période radioactive ou demi-vie est une caractéristique essentielle des radionucléides : c'est le temps au bout duquel la moitié des noyaux de l'isotope considéré se sont désintégrés.

Pour les isotopes de très courte demi-vie comme l' $[^{15}\text{O}]$, $[^{13}\text{N}]$ et le $[^{11}\text{C}]$, il est nécessaire d'avoir un cyclotron pour leur production à proximité du lieu de l'imagerie. Cependant pour le $[^{18}\text{F}]$, sa demi vie est de 2h ce qui a permis la mise en place d'un réseau de distribution et de livraison de ce MRP pour les centres n'ayant pas de cyclotron.

La quasi-totalité des émetteurs de positons produisent d'autres rayonnements. La capture électronique (CE) réorganise le cortège des électrons de l'atome ce qui produit une émission de rayon X et/ d'électron Auger. Ces derniers altèrent la qualité de l'image.

L'énergie maximale de la particule β^+ conditionne le libre parcours du positon dans le milieu avant l'annihilation. Lorsque ce parcours est long ($E_{\beta\text{max}}$ élevée) avant l'annihilation, il existe un biais de localisation du radionucléide ce qui entraîne une mauvaise reconstitution tomographique.

Voici dans le Tableau 2 ci-après les principales caractéristiques des émetteurs de positons les plus utilisés en imagerie TEP. Le Gallium n'est pas produit par un cyclotron mais par un générateur dont le noyau père est le Germanium 68 [⁶⁸Ge].

Tableau 2 : Les caractéristiques des principaux radioéléments utilisés en imagerie TEP

Radionucléide	Période physique	Mode de décroissance (%)	E _{β+max} (keV)	Parcours moyen du β+ (mm) dans l'eau	Produit de décroissance	Méthode de production la plus courante	Chimie	Exemples d'application
Fluor 18 ¹⁸ F	110 min	β+ (97) EC (3)	635	0,62	Oxygène 18 ¹⁸ O	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F (cyclotron)	Chimie organique	[¹⁸ F]FDG : analogue du glucose, traceur utilisé en oncologie
Carbone 11 ¹¹ C	20,4 min	β+ (99,8) EC (0,2)	960	1,1	Bore 11 ¹¹ B	¹⁴ N(d,n ⁴ He) ¹¹ C (cyclotron)	Chimie organique	¹¹ CH ₃ I utilisé pour le marquage de nombreuses molécules organiques comme le [N-méthyl- ¹¹ C]PIB marqueur des plaques amyloïdes
Azote 13 ¹³ N	9,96 min	β+ (100)	1190	1,5	Carbone 13 ¹³ C	¹⁶ O(p, ⁴ He) ¹³ N (cyclotron)	Chimie organique	¹³ NH ₃ utilisé pour marquer des acides aminés
Oxygène 15 ¹⁵ O	2,03 min	β+ (99,9) EC (0,1)	1720	2,5	Azote 15 ¹⁵ N	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O (cyclotron)	Chimie en phase gazeuse rapide	[¹⁵ O]H ₂ O utilisé pour visualiser le flux sanguin cérébral ou myocardique
Iode 124 ¹²⁴ I	4,18 j	β+ (25) EC (75)	2140	3,48	Tellure 64 ⁶⁴ Te	¹²⁴ Te(p,n) ¹²⁴ I (cyclotron)	Chimie organique	Marquage de macromolécules comme l'insuline ou encore de l'annexin V, marqueur de l'apoptose
Cuivre 64 ⁶⁴ Cu	12,7 h	β+ (18) β- (37) EC (45)	655	0,64	β+, CE : Nickel 64 ⁶⁴ Ni β- : Zinc 64 ⁶⁴ Zn	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu (cyclotron)	Chimie de chélation	⁶⁴ Cu-ATSM : traceur de l'hypoxie tumorale
Gallium 68 ⁶⁸ Ga	68,3 min	β+ (90) EC (10)	1900	3,48	Zinc 68 ⁶⁸ Zn	⁶⁸ Ge- ⁶⁸ Ga (Générateur)	Chimie de chélation	Analogues de la somatostatine (DOTA-TOC, DOTA-TATE)
Zirconium 89 ⁸⁹ Zr	3,3 j	β+ (23) EC (77)	897	1	Yttrium 89 ⁸⁹ Y	⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr (cyclotron)	Chimie de chélation	⁸⁹ Zr-trastuzumab, anticorps ayant une affinité pour les récepteurs HER2

Plusieurs caractéristiques sont nécessaires afin d'obtenir un « bon » MRP *in vivo* :

- Le radio-marquage doit être chimiquement stable et ne pas endommager la molécule vectrice par la liaison à l'isotope afin qu'elle conserve ses qualités de molécule traceuse.
- Une haute affinité et spécificité pour la cible. Des études de pharmacocinétique *in vitro* sont réalisées pour connaître les paramètres suivants :

- K_d : coefficient de dissociation du traceur qui correspond à la quantité de ligand exprimé en moles se liant à 50% de la cible. Il est déterminé par des études de saturation.
 - CI_{50} : concentration inhibitrice 50 qui correspond à la concentration en ligand qui inhibe 50% de la liaison spécifique.
 - K_i : constante d'inhibition qui est calculée selon la CI_{50} du ligand de référence utilisé et du type d'inhibition.
- La courte demi-vie de l'isotope doit permettre sa distribution au site d'intérêt. Dans notre cas, le MRP doit passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et se distribuer sur la cible au niveau cérébral avant la décroissance. Pour le passage de la BHE, il peut se faire par diffusion passive (poids moléculaire (PM) entre 400 et 600 daltons et lipophilie) ou par transport actif.
 - Le métabolisme de la molécule vectrice ne doit pas être trop rapide pour éviter l'apparition de métabolites radioactifs qui entraîne une détérioration de la qualité des images.
 - L'absence de toxicité pour le patient : lors d'un examen TEP, les doses des traceurs sont très faibles et ne doivent pas entraîner d'activation ou de blocage de la cible.
 - L'activité spécifique qui idéalement doit être importante afin d'injecter une faible quantité de MRP. C'est l'activité de radioactivité utilisée par unité de masse.

II.1.2.4 La détection en imagerie TEP

La caméra TEP est constituée de plusieurs cristaux scintillateurs regroupés en modules de détection disposés en anneau autour du lit d'examen. Tous les anneaux forment la couronne de détection. Selon la caméra, la couronne peut se déplacer le long de l'axe du lit, ou bien le lit d'examen peut se déplacer dans le sens horizontal sous la couronne de détection. Les deux photons γ sont détectés en même temps par les modules de détection qu'ils frappent. Des circuits électroniques permettent la vérification des informations reçues et les coïncidences vraies sont enregistrées : la coïncidence est acceptée si les deux événements arrivent dans une fenêtre de l'ordre de 10ns et si les deux photons ont une énergie proche de 511keV. L'accumulation de ces coïncidences vraies selon différentes valeurs d'angle de projection permettent la localisation du radioisotope dans les trois dimensions de l'espace au sein du patient.

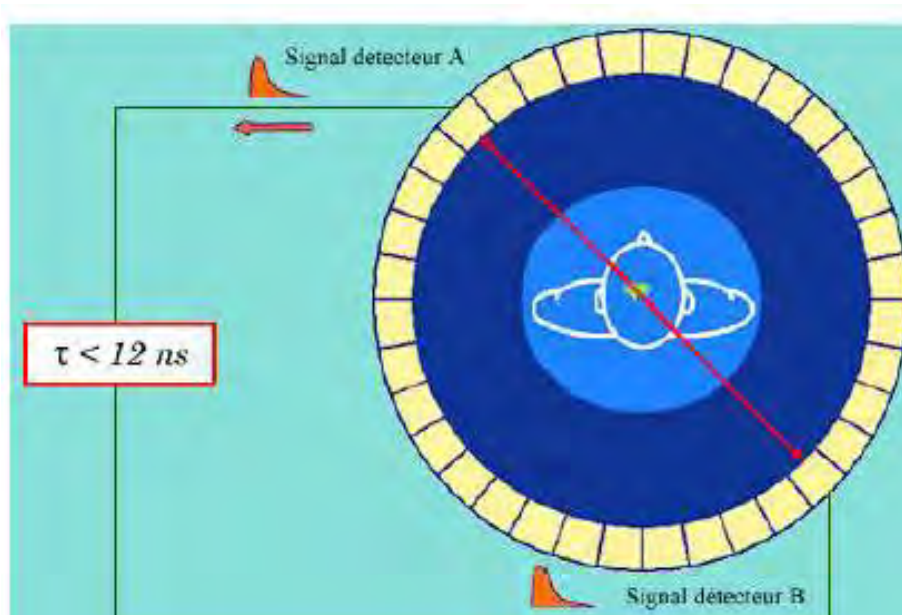


Figure 21 : Détection des photons γ en imagerie TEP

Ces données brutes sont ensuite traitées informatiquement par des algorithmes qui se chargent de les corriger en prenant en compte les caractéristiques de l'appareil et les paramètres physiques. La reconstitution tomographique de ces données optimisées permet de visualiser avec précision la distribution spatiale du traceur dans le milieu observé. Les images TEP résultent donc d'un comptage des coïncidences détectées sur chaque ligne de réponse, ce qui en fait une méthode d'imagerie quantitative.

L'intérêt d'utiliser des isotopes émetteurs de positons est double : ils peuvent facilement être incorporés aux molécules sans altérer leurs propriétés biologiques et permettent également de réaliser des reconstructions d'image en trois dimensions avec une très bonne sensibilité et résolution.

II.1.3 Biomarqueurs de l'imagerie moléculaire dans la MA

Dans la MA, l'imagerie TEP permet de mesurer quantitativement des processus biologiques importants altérés : les plaques amyloïdes, la DNF et les marqueurs de l'inflammation. Auparavant, le diagnostic certain de la MA était porté à l'autopsie, mais les recherches récentes menées sur les biomarqueurs de la maladie permettent aujourd'hui de porter un diagnostic du vivant du patient avec un haut degré de probabilité.

II.1.3.1 Courbe d'évolution des biomarqueurs

Ce chapitre va introduire les principaux biomarqueurs de la MA. Les variations anormales de ces biomarqueurs par rapport à un vieillissement normal y compris pendant les phases précoces de la maladie mettent en évidence les altérations structurelles et fonctionnelles cérébrales associées à la maladie. Les études de Jack Jr et al ont permis de modéliser la chronologie d'évolution des biomarqueurs dans la MA. (61)

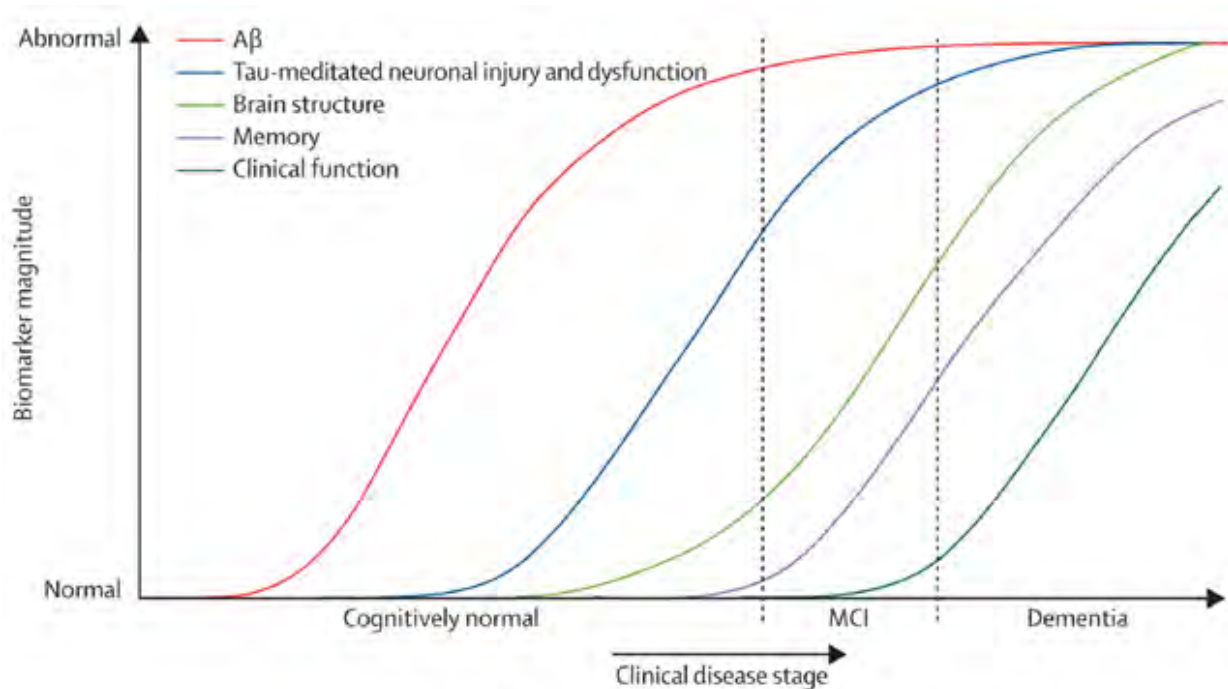


Figure 22 : Modèle hypothétique de la dynamique des biomarqueurs au cours de l'évolution en MA

Source : Jack Jr et al.,2010 (61)

Sur la Figure 22, le stade clinique de la MA est indiqué sur l'axe horizontal par des lignes verticales indiquant le moment où le diagnostic de déficit cognitif léger (MCI) et de démence est atteint.

L'accumulation du peptide amyloïde (en rouge) se produit très précocement à la phase pré-symptomatique pour atteindre un plateau et reste stable tout au long de la maladie. En revanche le taux de protéine Tau (en bleu) semble corrélé à la symptomatologie et au stade d'évolution de la maladie.

II.1.3.2 Les biomarqueurs de l'amylose

Les traceurs de la protéine β -amyloïde ont été développés pour permettre une mesure spécifique et quantifiable des lésions neuropathologiques précoces de la MA. Nous allons présenter les biomarqueurs de l'amylose actuellement utilisés en recherche clinique.

II.1.3.2.1 [^{11}C] -PIB

Le biomarqueur de référence développé exclusivement en recherche clinique est le [^{11}C] -PIB (marqueur B de Pittsburgh, marqué au carbone 11). Ce dérivé de la thioflavine présente une affinité spécifique pour les dépôts de peptide amyloïde ($K_d=1,4\text{nM}$) qui ont été imagés en TEP en 2002 (Figure 24). En raison de la courte demi-vie du ^{11}C , son utilisation est limitée au domaine de la recherche clinique et réservée aux centres possédant un cyclotron à proximité. Il a été montré dans de nombreuses études que le [^{11}C] -PIB se lie aux plaques $A\beta$ dans plusieurs régions corticales chez les patients atteints par la MA (62).

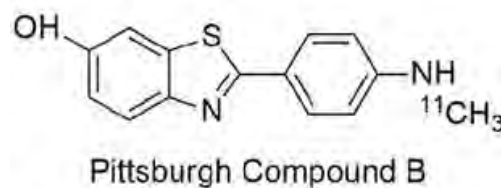


Figure 23 : [^{11}C] -PIB

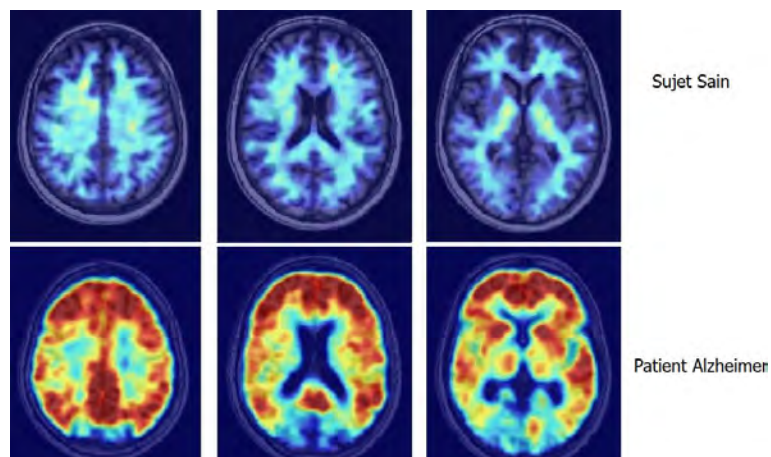


Figure 24 : Imagerie TEP au [^{11}C]-PIB

Sur la Figure 24, nous pouvons voir en bas un cerveau présentant la MA avec un TEP positif au PIB et en haut une déficience cognitive légère avec un TEP au PIB négatif.

II.1.3.2.2 Marqueurs fluorés : le [¹⁸F]-florbetapir, le [¹⁸F]-florbetaben et le [¹⁸F]-flutemetamol

De nouveaux médicaments radiopharmaceutiques marqués avec du [¹⁸F] ont été développés. Sa demi-vie est plus longue (110 minutes) ce qui permet l'utilisation de ces MRP par tous les centres disposant d'une caméra TEP. A ce jour, il existe trois médicaments radiopharmaceutiques à usage diagnostique, spécifiques des plaques amyloïdes, et autorisés par l'European Medicine Agency (EMA) et la Food and Drug Administration (FDA): le [¹⁸F]-florbetapir, le [¹⁸F]-florbetaben et le [¹⁸F]-flutemetamol. (63)

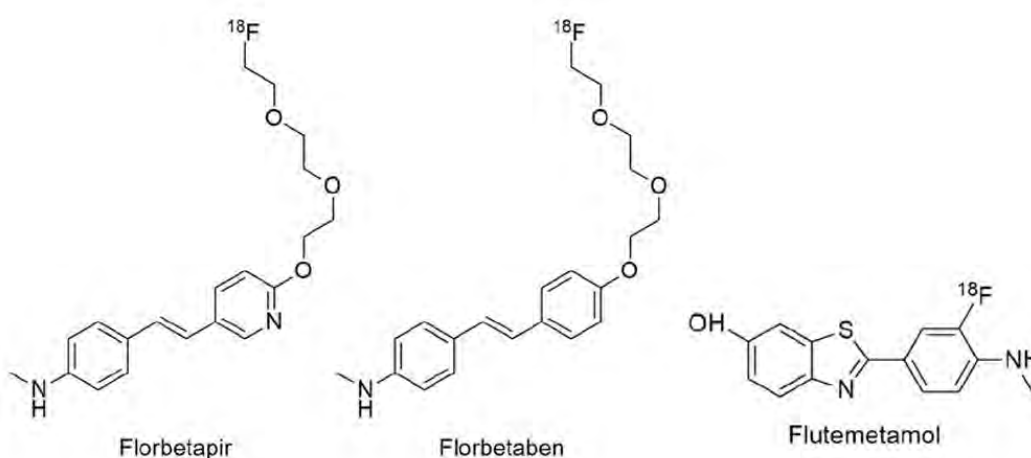


Figure 25 : Structure chimique des biomarqueurs fluorés de l'amylose

Le [¹⁸F]-florbetapir (également appelé [¹⁸F]AV45) est le premier marqueur qui a été approuvé par les autorités de santé pour le diagnostic de la MA. Les deux autres ont été approuvés ultérieurement et présentent une performance diagnostique superposable. Seules les modalités pratiques de l'examen diffèrent en termes de dose et de durée d'acquisition d'image sur la caméra TEP. (Tableau 3). Ces MRP n'ont pas montré d'affinité de liaison pour la DNF.

Tableau 3 : Caractéristiques principales des biomarqueurs fluorés de l'amylose

	[¹⁸ F]-florbetapir	[¹⁸ F]-florbetaben	[¹⁸ F]-flutemetamol
Nom commercial	AMYVID®	VIZAMYL®	NEURACEQ®
Kd	3,7nM	16nM	6,7nM
Activité recommandée (dose)	370MBq	185MBq	300MBq

Une fois que le diagnostic de syndrome démentiel est établi, ce sont les critères cliniques de McKhann (Annexe 1) qui permettent de retenir le diagnostic de MA. D'une façon générale, ces critères ont une sensibilité globalement satisfaisante, en moyenne 81%, mais une spécificité plutôt faible de 70% en moyenne pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable avec confirmation post mortem (64).

Une étude sur l'évaluation de l'utilité diagnostique de ces trois radiotraceurs a permis de mettre en évidence une sensibilité et une spécificité pondérées cumulées de 89.6% et 87.2% pour le florbetapir et 89.3% et 87.6% pour le florbetaben. Les résultats pour les traceurs marqués au [¹⁸F] sont supérieurs du point de vue sensibilité et spécificité par rapport aux marqueurs cliniques de McKhann couramment utilisés en pratique (65).

Du point de vue du patient, une bonne tolérance à ces radiotraceurs a pu être démontrée (66). Cependant, l'étendue et la distribution des plaques de A β ne semblent pas parfaitement corrélée aux profils de dégénérescence et de déficits cognitifs des patients atteints de la MA.(67). En effet, le dépôt A β semble être le point de départ d'une cascade d'autres événements neuropathologiques plutôt que le facteur déterminant de la neurodégénérescence et de la progression de la maladie (68).

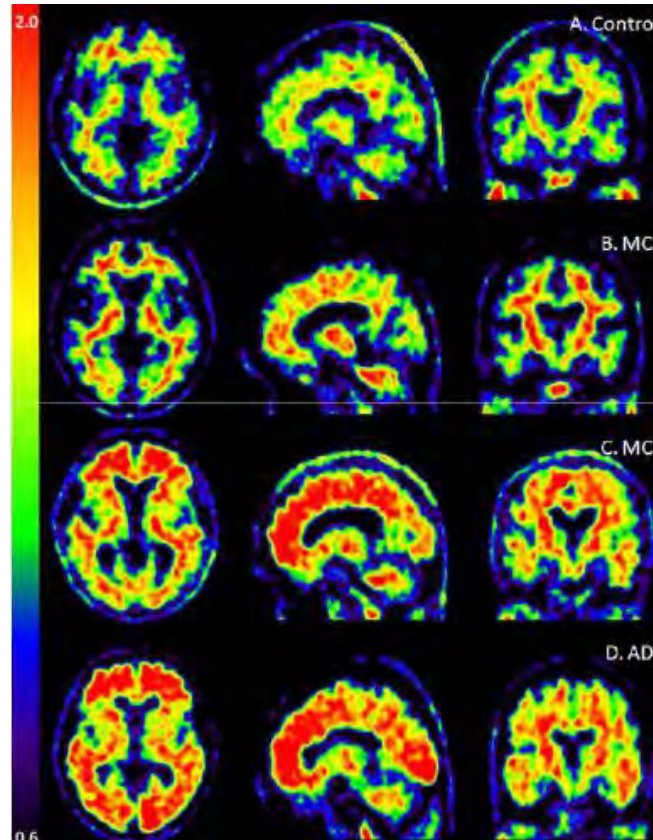


Figure 26 : Imagerie TEP au [¹⁸F]AV45. En haut un sujet contrôle et en bas un sujet avec la MA

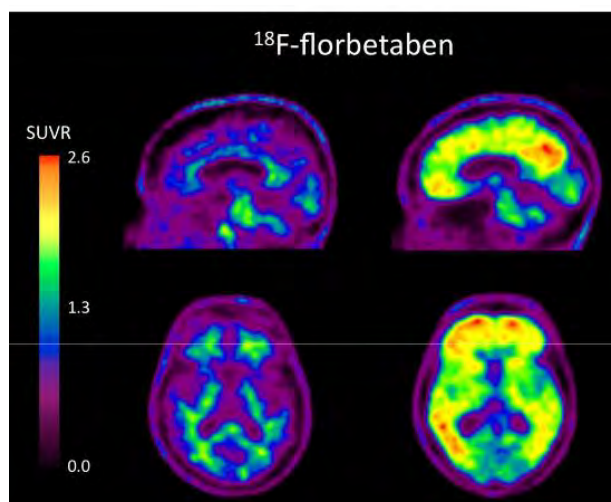


Figure 27 : Imagerie TEP au [18F]-florbetaben de deux sujets avec une démence. A gauche imagerie négative par TEP-amyloïde. A droite imagerie amyloïde positive.

La Société de médecine nucléaire et l'association d'Alzheimer ont défini des critères d'utilisation appropriés en 2013 en identifiant trois situations cliniques dans lesquelles l'imagerie TEP-amyloïde est recommandée pour clarifier le diagnostic : la déficience cognitive légère, les patients satisfaisant aux critères cliniques de base pour la MA possible et les patients jeunes atteints de démence. Ces trois radiopharmaceutiques sont principalement recommandés pour leur valeur prédictive négative : une charge amyloïde indétectable sera considérée comme incompatible avec une MA. En outre, un examen positif indique la présence de plaques amyloïdes cérébrales, mais ces plaques peuvent être présentes dans d'autres affections neurologiques que la MA.

Malgré une excellente capacité de diagnostic, l'imagerie par TEP-amyloïde n'est pas utilisée en pratique clinique actuellement en routine. En effet, la commission de transparence a statué sur le non remboursement de ces médicaments en France à l'heure actuelle.

L'imagerie TEP-amyloïde est, par ailleurs, beaucoup plus utilisée dans les essais cliniques : cela permet de perfectionner la sélection des patients participant à l'étude et d'évaluer l'efficacité thérapeutique.

II.1.3.3 Les biomarqueurs de la protéine Tau

Plusieurs produits radiopharmaceutiques pour TEP ont été développés pour cibler avec précision les conformations anormales de la protéine tau. La DNF correspond à un enchevêtrement neurofibrillaire de protéine tau hyperphosphorylée dont la présence et

l'étendue augmentent parallèlement à la durée de la maladie et à la gravité des symptômes (69). L'imagerie tau présente un fort potentiel pour faire progresser les diagnostics actuels vers des diagnostics précoces et plus précis des tauopathies.

Nous allons présenter les différentes familles de biomarqueurs existants de la protéine tau.

II.1.3.3.1 Le [¹⁸F]-FDDNP

Un des premiers traceurs de la protéine tau est le (2-(1-(6-[(2-[¹⁸F]fluoroéthyl)(méthyl)amino]-2-naphthyl)éthylidène)malononitrile). C'est un composé neutre, lipophile et fluorescent qui est rapidement métabolisé en composé hydrophile traversant la barrière hémato-encéphalique. Le fait que ces métabolites passent la Barrière Hémato-encéphalique (BHE), entraîne une grande fixation non spécifique au niveau du cerveau et donc un bruit de fond important sur les images. Pour interpréter les images d'un TEP au [¹⁸F]-FDDNP il faut prendre en compte la cinétique de ce radiotracer en utilisant deux temps de mesure (passage de la BHE et fixation au niveau cérébral pendant 30 minutes, puis période de « wash out ») (70). Ce traceur n'est pas spécifique de la DNF, il présente également une affinité pour les plaques Aβ : il n'est donc pas le meilleur choix.



Figure 28 : Structure chimique du [¹⁸F]-FDDNP

Six autres agents d'imagerie tau ont pu être développés grâce à un logiciel de relation structure-activité, à partir de composés de N-benzylidène-benzohydrazide utilisés pour la détection des PHF :

- Famille des THK- [¹⁸F] : [¹⁸F]-THK523, [¹⁸F]-THK5105, [¹⁸F]-THK5351
- [¹¹C]-PBB3: pyridinyl-butadiényl-benzothiazolium-3
- Famille des benzimidazoles pyrimidine : [¹⁸F]-AV-1451 (connu également sous le nom de flortaucipir ou T807), [¹⁸F]-T808

II.1.3.3.2 Famille des THK

Ce sont des dérivés benzimidazole et quinoline. Le premier radioligand sélectif de la protéine tau, le [^{18}F] -THK523 a été décrit par Okamura et al. Sa sélectivité pour la protéine tau phosphorylée est décrite grâce à des études post mortem et plusieurs expériences *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (71). Les études post-mortem ont permis de confirmer la forte corrélation entre la DNF et la sévérité de la démence : en effet la rétention du traceur était bien corrélée au score cognitif. *In vitro*, il a été montré que ce traceur se lie très peu aux plaques amyloïdes par rapport aux agrégats de tau : il est spécifique des lésions tau-PHF de la MA et ne se lie pas aux autres lésions de tau dans les tauopathies autres que la MA (72).

Parmi les autres composés THK, le [^{18}F] -THK5117 et le [^{18}F] -THK5105 présentent une meilleure cinétique, moins de liaison à la substance blanche et une plus grande affinité pour tau-PHF que le [^{18}F] -THK523 (73). Ces deux nouveaux traceurs permettent d'avoir une vision topographique plus claire des lésions.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des biomarqueurs de la famille des THK

	[^{18}F] -THK523	[^{18}F] -THK5105	[^{18}F] -THK5117
Kd tau	86nM	2,63nM	5,19nM

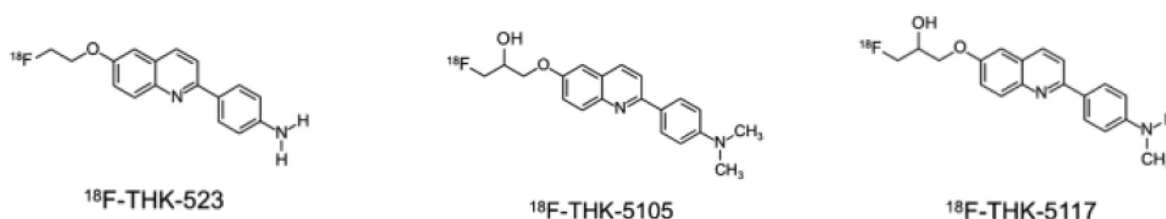


Figure 29 : Structure chimique des biomarqueurs de la famille des THK

II.1.3.3.3 Le [¹¹C]-PBB3

Ce traceur a une structure phényl/pyridinyl-butadiényl-benzothiazole/benzothiazolium.

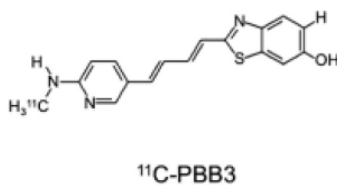


Figure 30 : Structure chimique du [¹¹C]-PBB3

Le [¹¹C]-PBB3 présente une forte affinité pour les DNF, une faible liaison sur la substance blanche, une bonne pénétration de la BHE et une élimination rapide. Cependant, il se métabolise en composé radiomarqué capable de traverser la BHE, ce qui limite sa quantification. Il présente également une rétention importante dans les noyaux gris centraux chez le patient atteint de dégénérescence corticobasale : il se fixe donc sur les PHF qui ne font pas partie de la MA (74). De plus, il présente également une affinité pour la plaque amyloïde ce qui en fait un traceur non spécifique de la DNF.

II.1.3.3.4 Famille des benzimidazoles pyrimidine

Le [¹⁸F]-AV-1451 et [¹⁸F]-T808 appartiennent à la famille des benzimidazoles pyrimidines (Figure 31). Ils ont une affinité nanomolaire pour les PHF et sont vingt-cinq fois plus sélectifs pour les PHF que pour l'Aβ. (75) (76). Le site de liaison des benzimidazoles se situe dans la partie C-terminale de la protéine tau sur le site ₃₈₆-TDHGAE-₃₉₁. (77)

Le [¹⁸F]-T808 présentait de bonnes propriétés pharmacocinétiques, mais sa dégradation entraînait un relargage de fluor.

Le [¹⁸F]-AV-1451 est le radioligand de tau le plus utilisé. C'est celui que nous avons choisi de prendre pour exemple dans notre analyse des coûts de production. Comme le [¹¹C]-PBB3, il présente une faible rétention dans la substance blanche. C'est une molécule lipophile, éliminée rapidement par le rein et présentant une faible accumulation dans les os et les muscles. Plusieurs études cliniques ont montré une étroite corrélation entre la liaison du [¹⁸F]-AV-1451 et les stades neuropathologiques de tau (78). Il est commercialisé et breveté par les laboratoires Avid/Lilly® et est aussi connu sous le nom [¹⁸F]-T807 dans les publications.

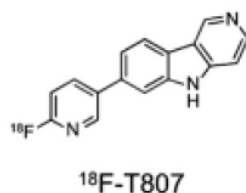


Figure 31 : Structure chimique du [^{18}F]-T807 ou [^{18}F]-AV1451

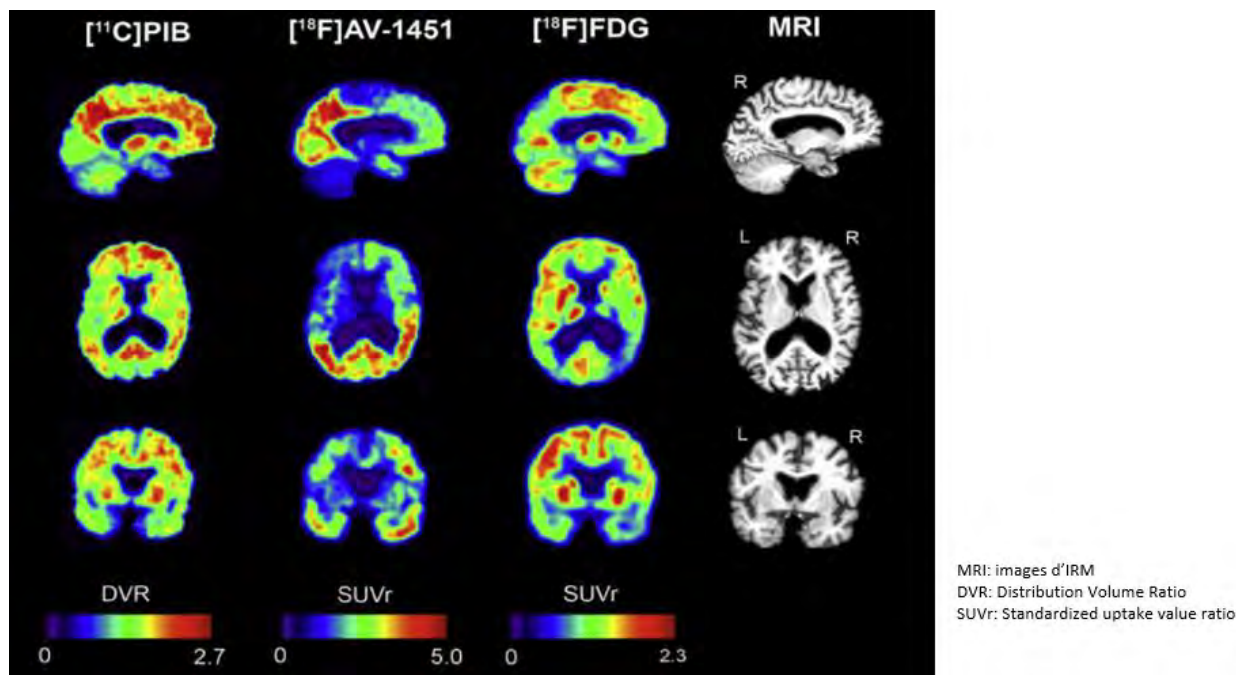


Figure 32 : Relation entre plaques amyloïdes (^{11}C]PIB), métabolisme (^{18}F]FDG) et DNF (^{18}F]AV-1451) chez un patient avec une forte probabilité d'être atteint de la MA

Récemment, une nouvelle molécule le [^{18}F] MK-6240 a été testé, *in vitro* sur des cerveaux de patients atteints de la MA et a montré une spécificité et une sélectivité élevée pour la DNF, ainsi que de bonnes propriétés pharmacocinétiques et aucune liaison hors cible contrairement à l' [^{18}F] -AV-1451. (79) (80) (81)

II.1.3.4 Les biomarqueurs de protéines de l'inflammation

Comme vu précédemment, la surexpression de la protéine translocateur (TSPO) dans la microglie activée constitue la cible principale de la neuroinflammation en imagerie TEP. Le traceur le plus utilisé était le [^{11}C] - PK11195 qui se lie à la TSPO avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Des traceurs fluorés avec une demi-vie plus longue ont ensuite été développés avec différents dérivés (82) (83) :

- Phénoxyarylacétamide : [¹⁸F] -FEDAA1106 (il cible la TSPO avec une affinité subnanomolaire et une grande sélectivité) ; [¹⁸F] -FEPPA ; [¹⁸F] -PBR06
- Imidazopyridine : [¹⁸F] -PBR111
- Pyrazolopyrimidine : [¹⁸F] -DPA-714

Ces composés se sont révélés plus sensibles et spécifiques, mais un polymorphisme dans le gène TSPO (rs6971) a été identifié. Ce dernier affecte la liaison au TSPO avec un impact significatif sur sa visualisation et sa quantification. Une nouvelle génération de radioligands TSPO insensibles au rs6971 a été développée comme le flutriciclamide [¹⁸F] -GE180. (84);(85) D'autres traceurs TEP de la gliose ont été testés comme le [¹¹C] -deuterium-l-déprényl qui se lie à la MOA-B. Les résultats sur les animaux transgéniques étudiés semblent indiquer que la gliose précède le dépôt de la plaque sénile (86).

Les traceurs TEP de la protéine tau sont de plus en plus utilisés dans les essais cliniques sur la MA qui étudient des médicaments afin de réduire la charge tau ou de plaques amyloïdes. L'effet indirect de la réduction de la charge amyloïde sur le dépôt des PHF en aval confirme l'hypothèse amyloïde. L'imagerie peut également aider à confirmer que les changements dans les dépôts de tau sont corrélés à la progression clinique de la maladie. Afin d'évaluer l'activité microgliale et la neuro-inflammation, plusieurs essais sont en cours avec le [¹⁸F] -DPA-714 chez des patients atteints de la MA.

III Description du process de fabrication de l' [¹⁸F] -AV1451

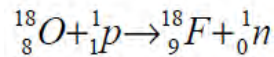
Nous allons à présent décrire la synthèse de l' [¹⁸F] -AV1451 telle que nous la réalisons à Toulouse. Nous présenterons ensuite le matériel et les ressources humaines nécessaires. Le but est d'effectuer une étude médico-économique sur le coût de la production de ce Médicament Radiopharmaceutique Expérimental (MRPE) pour les essais cliniques et la recherche fondamentale.

III.1 Synthèse de l' [¹⁸F] -AV1451

III.1.1 Production de l'isotope [¹⁸F]

Comme vu précédemment, le cyclotron biomédical IBA 10-5 de la plateforme de fluoration permet d'obtenir du fluor. Une cible contenant de l'eau enrichie (H₂¹⁸O) à 95% est bombardée

avec un faisceau de protons d'intensité variable de 5 à 10 MeV ce qui produit la réaction ci-après :



Équation 1 : Formation du [¹⁸F]

Classiquement, l'intensité du courant est de 37 μA pendant 60 minutes. Ceci permet d'obtenir environ 37 GBq de [¹⁸F]. La solution de [¹⁸F] irradiée est transférée sous pression d'hélium via des capillaires enterrés dans la hotte blindée contenant le module de synthèse pour la synthèse du MRP.

Chaque production fait l'objet d'un rapport qui contient tous les paramètres du tir (date, heure, courant cible, pression dans la cible, durée d'irradiation, activité recueillie) qui sera conservé avec le document de la préparation du MRP fluoré. Le transfert du [¹⁸F] du cyclotron vers l'automate a lieu après accord du radiopharmacien responsable et après fermeture à clef de la hotte blindée contenant l'automate de synthèse.

III.1.2 Synthèse du MRP

III.1.2.1 Le module de synthèse

Les activités de [¹⁸F] étant très importantes, l'automatisation de la synthèse est obligatoire pour la sécurité du personnel en termes de radioprotection. L'automate que nous avons au CHU est le Synchron R et D (Société RayTest GmvH, Straubenhardt, Allemagne ; Système de synthèse nucléophile ¹⁸F RetD) installé dans une hotte blindée de classe A. Ce module possède 9 entrées possible de substrats, 1 réacteur en verre traité, 1 sortie HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance), 25 électrovannes à 2 ou 3 voies et 5 compteurs Geiger-Müller. (Figure 33)

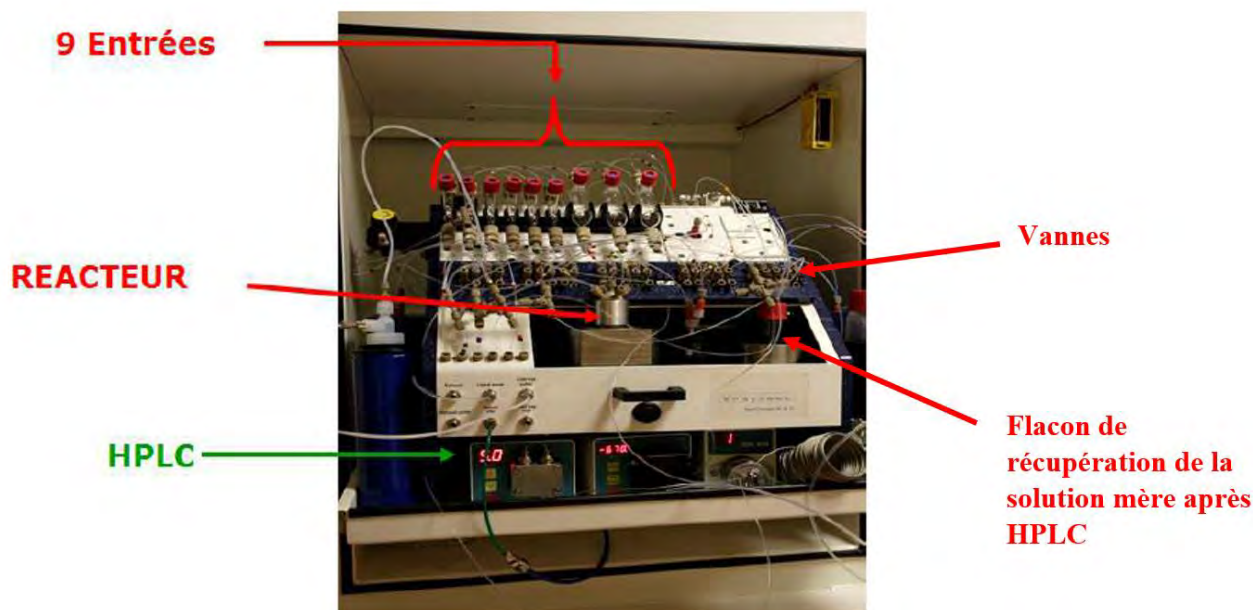


Figure 33 : Module de synthèse

Cet automate est commandé à distance grâce à un ordinateur : la succession des étapes du procédé est programmée et automatique (ouverture et fermeture des vannes, chauffage, refroidissement du réacteur). Un contrôle manuel est possible durant toute la synthèse.

Avant l'apport de la solution fluorée, le module doit être préparé et les flacons sont remplis de différentes solutions adaptées à la synthèse à réaliser :

- Flacon 2 : 2.5 mg de précurseur AV1451 dans 1.5 ml de DMSO
- Flacon 3 : 900 μ L D'HCl 1N
- Flacon 4 : 1mL de citrate de sodium 0.5 M + 400 μ L de NaOH 2N
- Flacon 5 : 2 ml d'éthanol
- Flacon 8 : 3 ml d'acétonitrile
- Flacon 10 : 10 mL d'EPPI

III.1.2.2 Substitution nucléophile

La solution irradiée de [^{18}F] qui arrive dans le module de synthèse grâce à un flux d'Hélium depuis le cyclotron passe ensuite sur une résine échangeuse d'anions (QMA sous forme de cartouche sep pack). Les anions fluorure enrichis $^{18}\text{F}^-$ sont retenus sur la colonne et l'eau enrichie est récoltée dans un flacon déchet. Le Carbonate de potassium (K_2CO_3) permet de déplacer la liaison du fluorure sur la cartouche. Une solution de Kryptofix 222 est utilisé pour

dissoudre le fluor en milieu organique. Le milieu organique utilisé est de l'acétonitrile. Une fois les anions fluorure décrochés de la colonne, ils sont envoyés avec l'éluât dans le réacteur. Pour que la réaction de substitution nucléophile puisse se produire, il faut éliminer toutes les traces d'eau dans le réacteur : le fluorure n'est réactif qu'en milieu organique. La solution est évaporée à 85°C-95°C pendant 4 à 6 minutes puis un séchage azéotropique est ensuite réalisé grâce à l'ajout de 0,5mL d'acétonitrile sous un flux d'azote médical. Ce processus de séchage est réalisé trois fois.

1,5 à 2mg du précurseur, l'AV1622 sont dilués avec 1,5mL de DMSO pour être transférés dans le réacteur avant d'être chauffée à 100°C pour réaliser la substitution nucléophile comme sur la Figure 34.



Figure 34 : Etape de substitution nucléophile du groupement chimique « partant » par l'atome de fluor radioactif lors de la radiosynthèse du [¹⁸F]-AV1451

Une fois la synthèse effectuée, il y a dans le réacteur :

- Le [¹⁸F] qui n'a pas réagi
- Le précurseur froid qui n'a pas réagi
- Le précurseur fluoré d'intérêt l' [¹⁸F]-AV1451 mais il contient des groupements protecteurs

III.1.2.3 Hydrolyse

Pour retirer les groupements protecteurs de notre molécule d'intérêt, une hydrolyse avec de l'HCl 3N (0,9mL) est effectuée avec un chauffage du mélange à 100°C pendant 5min (Figure 35). Lorsque la température diminue, une neutralisation est réalisée avec du NaOH 3N (350μL) et du citrate trisodique 1M (1mL)

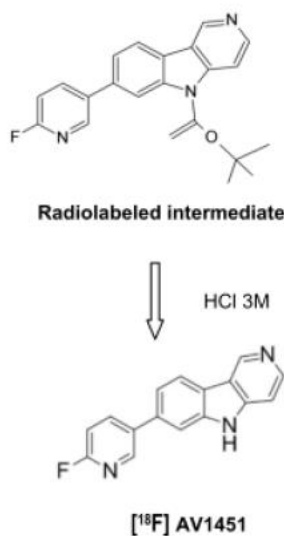


Figure 35 : Etape de déprotection lors de la radiosynthèse de l' [¹⁸F] -AV1451

III.1.2.4 Pré-purification sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction)

Le mélange brut obtenu est ensuite prépurifié par une méthode d'extraction en phase solide (cartouche C18): la molécule d'intérêt est adsorbée sur une phase stationnaire et est ensuite récupérée par lavage.

Dans notre cas, la cartouche C18 est activée par 10mL d'eau purifié (solvant polaire). Le [¹⁸F]-AV1451 est lipophile, et donc capté par la colonne C18, alors que les ions fluorure qui n'ont pas réagi, ne se fixent pas sur la colonne et sont éliminés. La colonne C18 est ensuite éluée avec 2mL d'éthanol ce qui permet de récupérer :

- Le précurseur froid qui n'a pas réagi
- Le précurseur fluoré d'intérêt l' [¹⁸F] -AV1451

III.1.2.5 Purification HPLC

Cette solution est injectée sur la boucle HPLC pour être purifiée. Il s'agit d'une colonne Zorbax Eclipse XBD C18, 9,4 x 250 mm, 5μ. Le solvant est le mélange éthanol/acétate de sodium 0,1M (45/55) avec un débit d'écoulement de 2mL/min. Selon la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire (colonne). Les composés se répartissent selon leur affinité entre la phase mobile et stationnaire et sont mis en évidence en sortie de colonne grâce à 2 détecteurs :

- Gamma pour les radionucléides
- UV pour les autres composés

Grâce à des tests réalisés, les temps de rétention de notre composé d'intérêt sont connus ce qui permet de le collecter en sortie de colonne. Tant que le solvant sortant de l'HPLC ne contient pas la molécule d'intérêt, le solvant est dirigé vers la poubelle. Dès que le pic correspondant à la molécule d'intérêt est visualisé, une vanne doit être basculée manuellement pour que le solvant soit dirigé dans le flacon « product » possédant une dérivation vers la hotte de mise en forme.

Sur cette colonne le temps de rétention du [^{18}F]-AV1451 est de 15 à 18min.

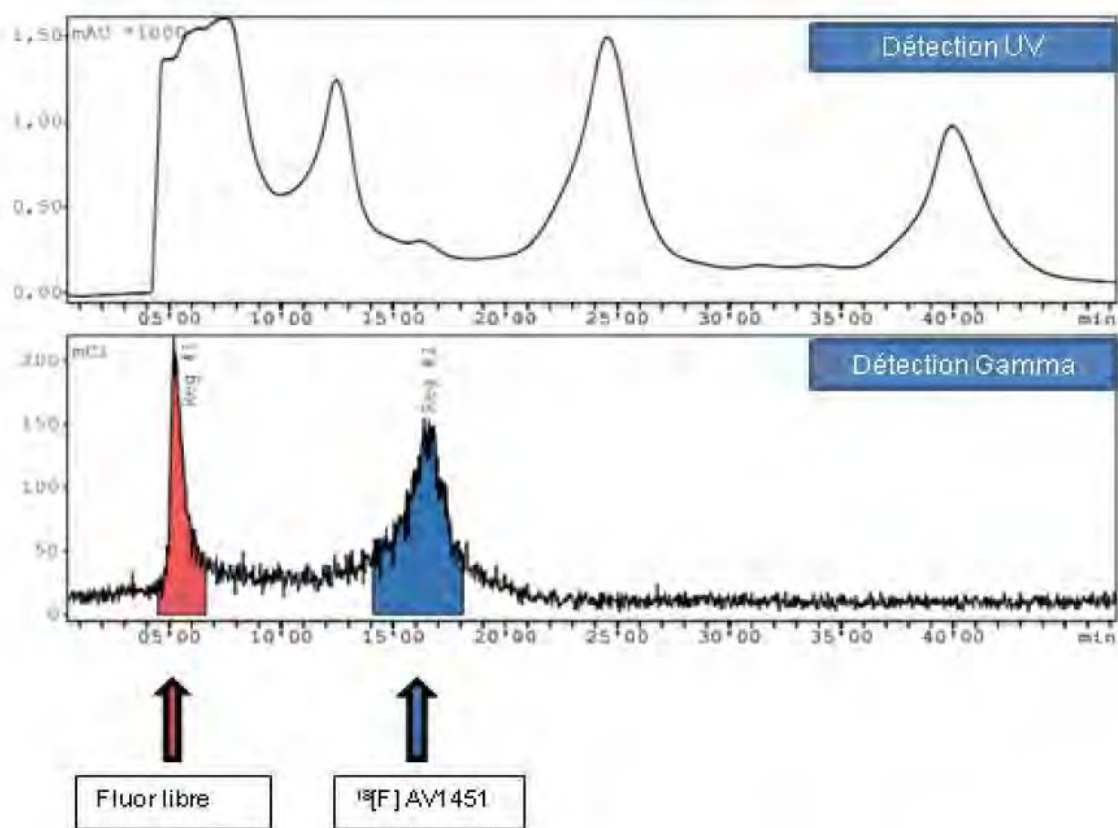


Figure 36 : Chromatogramme de purification sur colonne semi-préparative du [^{18}F]-AV1451 avec double détection (UV et gamma) en sortie de colonne

III.1.2.6 Mise en forme

Le radiopharmaceutique obtenu doit être mis en forme dans un solvant compatible à une injection chez l'homme.

Si la phase mobile utilisée sur l'HPLC comporte des solvants toxiques (méthanol, acétonitrile) il peut être nécessaire de faire une nouvelle purification.

De plus il est possible d'ajuster le pH avec du bicarbonate s'il est trop acide et de corriger l'osmolarité en diluant dans du sérum physiologique.

Dans notre synthèse, la solution mère obtenue (2mL environ) est transférée dans une enceinte classe A pour la mise en forme et pour être filtrée avec un filtre 0,22 μ m (filtration stérilisante) dans un flacon Elumatic. Une deuxième filtration de ces 2mL est effectuée avant de faire une dilution dans 8mL de NaCl. (Dilution pour répondre aux exigences de la Pharmacopée européenne <100mg/mL en termes de teneur en éthanol d'une solution injectable)

Une seringue pour effectuer les contrôles qualités est alors prélevée dans l'Elumatic.

III.2 Contrôles qualité sur le produit fini

Parmi les tests à réaliser sur le produit fini il y a :

- Les tests à réaliser en routine de manière systématique pour chaque production
 - o Contrôles qualités (CQ) libératoires
 - o CQ différés
- Les tests supplémentaires : dosage des solvants résiduels (acétone, éthanol, acétonitrile et DMSO) à réaliser sur les trois lots de validations du DME (Dossier de Médicament Expérimental) permettant de valider le procédé de fabrication.

Ainsi, la réalisation des CQ nécessite de disposer de matériel spécifique, notamment une HPLC/UV avec interface d'acquisition ACQUIS®, et d'un local dédié à la réalisation de ces contrôles.

III.2.1 Les contrôles qualité libératoires

Les CQ libératoires utilisées en routine sont les suivants :

- L'aspect macroscopique de la solution
- Le pH est réalisé à l'aide de papier pH qui a une sensibilité de 1 unité de pH. 10 μ L de solution finale sont déposés et comparés à la norme du fournisseur (échelle de couleur)
- La pureté radiochimique (PRC) est évaluée avec l'HPLC couplée à un détecteur gamma et UV. L'acquisition est obtenue avec le logiciel Acquis. 20 μ L de la solution sont

injectés pour être séparés sur la colonne Luna phenomenex C18 5µm 150*4.6mm. La phase mobile est le Solvant acétate de sodium/acétonitrile (60/40) avec un débit de 1,5mL/min et L270nm. La PRC est déterminé en calculant le rapport de l'aire du pic de la molécule d'intérêt sur la somme des aires de chaque pic. Le but est de détecter les impuretés. Le temps de rétention de la molécule d'intérêt est connu grâce à un standard non radioactif. (Précurseur AV1622 : 8-9min ; Précurseur déprotégé mais non fluoré : 3 à 5 min ; AV1451 : 5-6min)

- La pureté chimique est réalisée grâce à un test colorimétrique avec des bandelettes imprégnées d'acide iodoplantinique et d'iodure de potassium afin de détecter la présence résiduelle de Kryptofix.
- La mesure de la solution radioactive dans un activimètre contrôlé quotidiennement permet d'obtenir grâce au volume de la solution, l'activité volumique en GBq/mL.
- Le test d'intégrité des filtres correspond au test du point bulle dans la pharmacopée européenne. (01/2005 : 50101, 5.1.1 « *Methods of preparation of sterile products* » p 445-447). Le filtre doit résister jusqu'à une certaine pression indiquée par le fabricant. S'il n'y résiste pas, c'est qu'il a été endommagé avant ou durant la filtration qui risque de ne pas avoir été efficace.
- La pureté radionucléidique (PRN) est déterminée grâce au calcul de la demi-vie. Pour cela, l'activité de la solution (A1 et A2) est mesurée à deux temps différents (t1 et t2) et la formule suivante est utilisée pour le calcul.

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

Équation 2 : Période radioactive calculée à partir de la mesure d'un échantillon à deux temps différents

III.2.2 Les contrôles qualité différés

Les contrôles qualités différés sont réalisés sur chaque production, mais comme leur résultat n'est pas instantané, ils ne peuvent pas être libérateurs.

Le test de stérilité est effectué conformément à la Pharmacopée Européenne. (*Parenteral preparation*, 07/2005 : n°0520, p 3144-3146 et *Biological test*, 01/2005, n° 20601, p145-149).

Il s'agit d'une mise en culture sur des milieux spécifiques pour bactéries anaérobies, aérobies et mycologiques. Une mise en culture témoin avec de l'eau PPI est effectuée parallèlement. Aucun trouble du milieu ne doit être observé après 14 jours.

La mesure des endotoxines bactériennes (test LAL : Limulus Amoebocyte Lysate test) est effectuée grâce à un appareil : Lonza QCL-1000®Limulus Amebocyte Lysate US. Elle est actuellement faite de manière différée par l'institut fédératif de biologie.

III.2.3 Le dosage des solvants résiduels

La recherche des concentrations en acétonitrile, DMSO, éthanol et acétone sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse. Il s'agit de rechercher les solvants utilisés lors de la purification HPLC. Les taux limite sont renseignés dans l'ICH (Internal Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals human)

Ce dosage est uniquement réalisé sur les 3 lots de validation du processus de fabrication. Il est réalisé de manière différée par le laboratoire de toxicologie du centre hospitalier de Limoges.

Tableau 5 : Résumé des contrôles qualités réalisés sur l'¹⁸F]-AV1451 et spécifications attendues

Test	Methode	Spécifications
CQ libératoires		
Aspect macroscopique	visuelle	solution limpide, incolore, exempte de particules
pH	papier pH	entre 6 et 8
PRC	HPLC	>95%
Pureté chimique	test colorimétrique	<2,2mg/Vmax
Intégrité du filtre	point bulle	>3,45Bars
PRN	Décroissance du fluor	T=105-115min
CQ différés		
Stérilité	inoculation directe	stérile
Endotoxines bactériennes	LAL test	<17,5UI/mL
CQ pour le DME		
Solvants résiduels	CPG	acetonitrile<450ppm DMSO<5000ppm ethanol<10% (m/V) acetone<5000ppm

III.3 Injection à un patient

Une fois les contrôles qualités réalisés, les fiches d'enregistrement remplies et la décision de libération du lot pour injection validée, la préparation de la seringue pour le patient peut être effectuée. Il est nécessaire qu'elle soit protégée par un protège seringue plombé pour des raisons de radioprotection du personnel.

III.4 Expédition d'un flacon pour un autre centre

Nous avons la possibilité d'expédier des sources non scellées en dehors de la plateforme de fluoration lorsque la demande de MRPE est effectuée par un centre extérieur au CHU (Centre Hospitalo-Universitaire) de Toulouse.

Pour toute utilisation d'une source en dehors du périmètre de la plateforme de fluoration, le radiopharmacien en charge de la libération du lot devra s'assurer que l'utilisateur est bien autorisé par l'Autorité de Sureté Nucléaire à utiliser le fluor 18 pour les activités délivrées.

En pratique, pour céder une source il faut que l'utilisateur soit titulaire d'une autorisation d'utilisation délivrée par l'ASN (Autorité de Sureté Nucléaire) ainsi que du bon IRSN (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire) correspondant au fournisseur (Annexe 2).

Le MRPE est conditionné dans un flacon « Elumatic » de 15 ml en verre, incolore, type I de la Pharmacopée Européenne, fermé par un bouchon de caoutchouc et scellé par une capsule en aluminium. Il est ensuite positionné dans le pot plombé (conditionnement secondaire) tapissé d'une éponge absorbante (Figure 37).



Figure 37 : Pot plombé et éponge absorbante

Ce conditionnement secondaire est ensuite positionné dans un pot en polyéthylène avec bouchon à vis et avec une mousse de calage qui est présente dans le fond du pot.



Figure 38 : Pot en polyéthylène et mousse de calage

Le pot de manutention est calé dans le fût de transport avec un système de 2 calages en carton : un dessous le pot, l'autre dessus. Ce fût est systématiquement scellé lors de l'expédition.



Figure 39 : Fût de transport et système de calage

Le flacon ainsi que le pot de manutention sont étiquetés avec une étiquette présentant plusieurs informations comme sur la Figure 40

Nom de l'essai Clinique :
 Nom du Produit :
 Calibration : [][][][] MBq à heure/jj/mm/aaaa
 Volume : [][] ml
 Mention : Médicament pour essai clinique, solution pour perfusion IV
 Site de production Plateforme de fluoration-CHU de Toulouse
 Numéro de lot : XXXXXXXXX
 Date de péremption : heure/jj/mm/aaaa
 Initiales patients : [][][][][][][]
 N° patient XXXXXXXXX

Pour la recherche mixte (code IRSN 005) :

Nom du Produit :
 Calibration : [][][][] MBq à heure/jj/mm/aaaa
 Volume : [][] ml
 Mention : Traceur radioactif-Ne pas utiliser chez l'Homme
 Site de production : Plateforme de fluoration-CHU de Toulouse
 Numéro de lot : XXXXXXXXX
 Date de péremption : heure/jj/mm/aaaa

Figure 40 : Exemple d'étiquetage pour expédition d'un MRPE

Après la mise en place du flacon convenablement étiqueté, le fût de transport est scellé et un contrôle du débit de dose sera réalisé sur le fût en quatre points. Ces mesures seront notées et archivées sur la « check list » qui sera complétée lors de chaque envoi. Ces mesures de débit seront réalisées à l'aide d'une Victoreen 450/Fluke®.

IV Etude de faisabilité et de coût pour la recherche institutionnelle

IV.1 Contexte

La plateforme de fluoration du centre TEP est une structure appartenant au CHU de Toulouse. Elle permet la production de MRP pour le CHU de Toulouse qui est son propre client, et pour des clients extérieurs (équipe de recherche, autres CHU...).

Il s'agit d'une activité avec une production fluctuante. En effet, avant de pouvoir vendre les doses de MRP, il est nécessaire d'intégrer les années sans production pour nos clients où nous réalisons les recherches bibliographiques sur les synthèses, les lots de validation pour les Dossier de Médicament Expérimental (DME) et la mise en place des synthèses en pratique.

Il est essentiel de maîtriser nos coûts et de définir le « bon prix » pour le travail accompli afin de pouvoir tendre vers une entité à l'équilibre budgétaire. Pour cela, il faut évaluer les coûts et recettes prévisionnelles afin de réaliser un devis selon les prestations demandées par nos clients.

Actuellement, plusieurs types de synthèses sont réalisés en routine sur la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse (Figure 41) :

- Pour la recherche fondamentale.
- Pour les essais cliniques institutionnels, dont le CHU de Toulouse est promoteur : dans ce cas-là, nous sommes notre propre client.
- Pour des expéditions, dans le cadre d'essais cliniques sur d'autres CHU ne disposant pas d'un cyclotron.

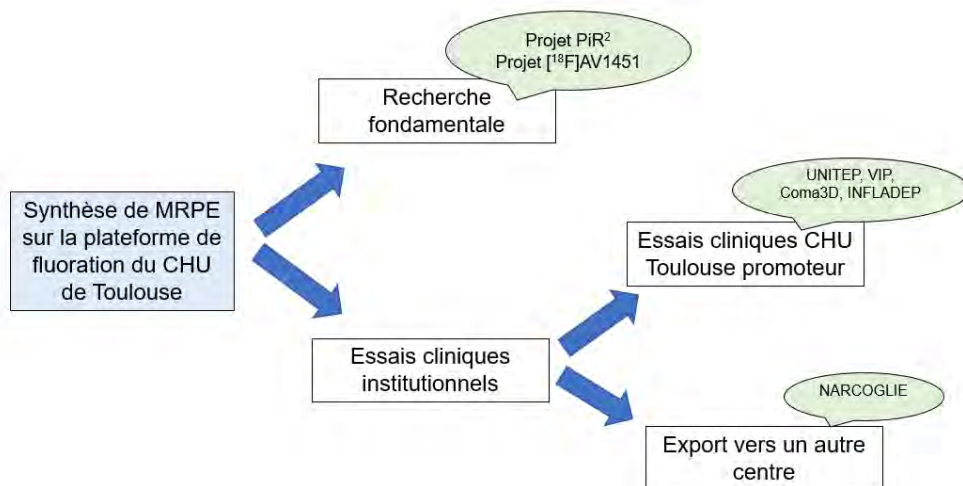


Figure 41 : Finalité de la production des MRPE au CHU de Toulouse

Pour la mise en place d'un essai clinique, l'investissement humain est très important, en raison de la rédaction du DME par le pharmacien. Il se compose de trois parties (1 : données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique ; 2 : données non cliniques (toxicologiques) ; 3 : données cliniques). Ce DME sera présenté avec le protocole devant le Comité de Protection des Personnes (CPP) afin d'obtenir son accord avant de pouvoir le soumettre à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) pour validation de l'étude.

Pour la recherche fondamentale, beaucoup moins de documents sont nécessaires, ce sont des démarches allégées. S'il est nécessaire d'utiliser des animaux, il convient tout de même d'obtenir l'accord d'un comité éthique animal.

IV.2 L'exemple d'un MRPE ciblant la protéine tau

Nous avons fait le choix de travailler sur l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451, MRPE ciblant la protéine tau en raison de plusieurs demandes sur notre plateforme et de l'enjeu scientifique dans un projet récent de recherche fondamentale. L' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 ne dispose pas d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) mais nous avons réalisé en 2016 un DME ce qui nous permet de pouvoir le produire sur notre plateforme.

Les grands essais cliniques récents dans le domaine de la MA sont des échecs. Ces derniers sont notamment expliqués par la faiblesse de la recherche préclinique sur cette pathologie qui repose sur une mauvaise modélisation animale de la MA chez la souris transgénique. La modélisation cellulaire *in vitro* ne permet pas de recréer un réseau de neurones complexe pour

étudier la dissémination longue distance de protéines pathologiques de neurone en neurone impliquant les cellules gliales. Ainsi, il est fondamental de développer une recherche préclinique étudiant un système nerveux proche de celui de l'Homme. Pour cela, dans le projet pour lequel nous sommes sollicités pour synthétiser de l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451, les études vont être réalisées sur des singes.

Dans ce projet de recherche fondamentale, pour étudier la dynamique de propagation de la protéine tau dans le cerveau, des protéines tau anormales issues de cerveaux de patients vont être directement injectées dans les cerveaux de cinq singes, dans différentes régions clés pour le développement de la maladie. Ces cinq singes seront suivis pendant deux ans afin d'observer les troubles cognitifs développés et pour suivre l'évolution de la protéine tau grâce au TEP-scanner à l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 et à l'IRM. Ces animaux réaliseront ces imageries juste après l'injection, puis tous les six mois pendant deux ans (Figure 42).

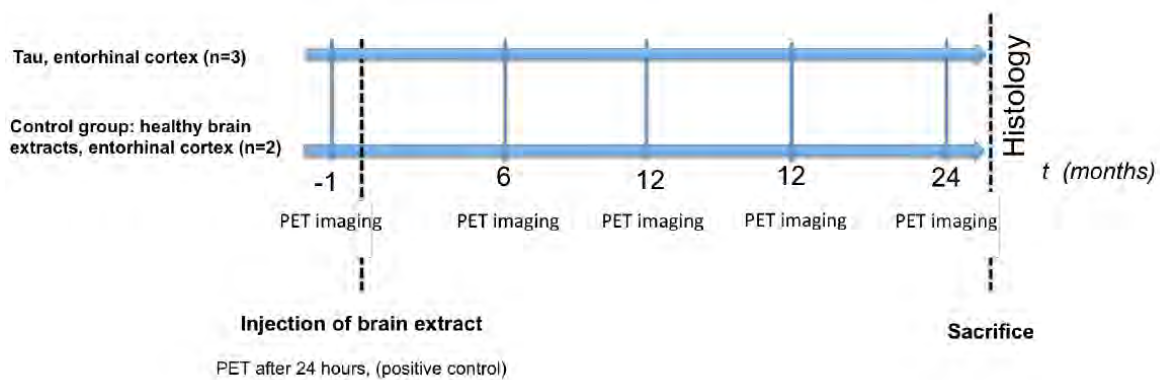


Figure 42 : Schéma du déroulement des imageries pour l'étude

Cette étude si elle est concluante devrait permettre :

- la validation de la propagation "prion-like" de la tauopathie dans la MA si de la protéine tau est retrouvée à distance du point d'injection.
- d'apporter une démonstration expérimentale au modèle de Braak, supposé résumer le développement de la MA (selon le site d'injection, la propagation de la tauopathie se fera selon les connections anatomiques des régions cérébrales concernées).
- de mieux comprendre les différents sous-types de MA et le rôle de la pathologie amyloïde associée.
- de mieux caractériser la pertinence des méthodes d'imagerie actuelle (TEP-tau et IRM) pour suivre l'évolution de la MA in vivo et appliquer ces résultats chez l'Homme. Les corrélations

IRM-histologie permettront d'identifier les meilleurs marqueurs d'évolution de la maladie pour s'en servir ensuite avec plus de pertinence en pratique clinique.

- d'établir un modèle animal pré-clinique qui permettra de tester de nouvelles molécules thérapeutiques

Afin de maintenir l'équilibre budgétaire au sein de notre plateforme, nous avons travaillé au calcul du prix le plus juste à proposer à l'équipe de recherche pour la synthèse de l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451.

IV.3 Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude est de pouvoir proposer un prix adapté aux coûts engagés pour chaque type de synthèse réalisée dans notre structure, à savoir :

- La recherche fondamentale
- Les essais cliniques réalisés à Toulouse
- Les essais cliniques réalisés sur un autre centre lorsqu'une expédition est effectuée

Pour évaluer le coût de la synthèse d'un MRP, nous avons réalisé une estimation des consommables nécessaires à la synthèse et répertorié tous les équipements utilisés. Une évaluation du temps et du personnel requis a également été effectuée. Nous avons ensuite établi une méthode pour analyser nos données de manière à obtenir différents tarifs par dose selon le type de synthèse.

IV.4 Méthode utilisée

Comme vu précédemment, plusieurs étapes sont nécessaires pour synthétiser un MRP :

- La préparation de l'automate de synthèse
- La production du Fluor par le cyclotron
- La synthèse du MRP d'intérêt
- La purification du MRP d'intérêt
- Les contrôles qualités sur la solution mère
- L'expédition du MRP (s'il s'agit d'une production pour un autre centre)

IV.4.1 Recueil des coûts

Dans le but d'évaluer le coût de la synthèse d'un MRP sur la plateforme de fluoration du CHU de Toulouse, nous avons retenu une méthode de coûts complète proposées par le Ministère de la Santé et la Direction générale de l'offre de soins selon un guide paru en 2011 (87). Nous avons utilisé les données de la comptabilité de 2016 à 2020.

Notre calcul se décompose en trois sections :

- Les dépenses du titre 1 liées au temps personnel
- Les dépenses du titre 2 de type matière première, consommables et maintenance de l'équipement
- Les dépenses du titre 4 d'amortissement de l'équipement

Dans cette méthode, le titre 3 correspond aux dépenses d'hôtellerie, non prises en compte dans notre étude. Le titre 5 correspondant aux frais de structure, logistique générale n'a pas été pris en compte étant donné qu'il s'agit d'une plateforme appartenant au CHU.

A partir du calcul de ces trois titres de dépenses, nous avons estimé le coût théorique d'une synthèse en fonction du nombre de synthèses totales.

IV.4.1.1 Rapport d'activité et prévisions

Nous avons réalisé un recueil du nombre de synthèses réalisées et du nombre de patients injectés sur la plateforme de fluoration de 2016 à 2020. Cette étude est rétrospective sur trois ans et demi de 2016 à mi-2019. Pour la période de mi-2019 à 2020, nous nous sommes basés sur les plannings prévisionnels des essais cliniques. Toutes ces données sont consignées dans un tableur Excel[®].

Cette large période d'étude est nécessaire afin d'obtenir un coût de synthèse représentatif, prenant en compte le coût de la recherche et du développement des synthèses, ainsi que la rédaction des différents DME. Ces étapes de mise au point pour les MRP utilisés à l'heure actuelle ont eu lieu de 2016 à 2018.

IV.4.1.2 Détermination des dépenses

IV.4.1.2.1 Dépenses de titre I

Les dépenses de titre 1 sont liées au temps personnel. (Tableau 8)

Il y a deux catégories de personnel participant aux synthèses sur la plateforme :

- Le personnel médical (PM) : un pharmacien hospitalier (PH) cyclotroniste et un pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire (AHU)
- Le personnel non médical : un préparateur en pharmacie hospitalière (PPH)

Nous avons considéré qu'une synthèse mobilise le personnel pendant une journée de 7h. Cela comprend la mise en place de l'enceinte blindée, la synthèse, les contrôles qualités, la traçabilité et la gestion des stocks. Sur la plateforme, lors des synthèses sont présents un pharmacien et un PPH.

Pour manipuler le cyclotron, seule une personne possédant un Certificat d'Aptitude à Manipuler les Appareils de Radiologie Industrielle (CAMARI), délivré par l'IRSN est autorisé à le piloter. Au CHU de Toulouse c'est un radiopharmacien qui est CAMARI et PCR (Personne Compétente en Radioprotection) du cyclotron. Cette fonction de PCR nécessite la présence du PH un jour par mois sur la plateforme pour accomplir ses missions.

IV.4.1.2.2 Dépenses de titre II

Les dépenses au titre II sont liées aux maintenances des équipements, aux contrôles environnementaux et aux consommables utilisés (Tableau 8)

Ces dépenses comprennent :

- La maintenance du cyclotron, réalisée sous forme de forfait annuel. Pendant un période de 4 ans, entre 2014 et 2017, le contrat de maintenance du cyclotron comprenait deux maintenances par an, des visites d'urgence si besoin et une formation « training » sur une durée de cinq jours pour le personnel assurant la synthèse des MRP durant l'année. Grâce à ces formations, en 2018, un contrat plus économique a pu être souscrit comprenant uniquement deux maintenances de trois jours par an. Le prix du remplacement de pièces est également inclus dans le contrat de maintenance.

- La maintenance de l'enceinte de mise en forme, sous forme de forfait annuel.
- Le changement des vannes de l'automate de synthèse et le divers petit matériel.
- La gestion des déchets
- Le contrôle qualité du lot de précurseur du médicament pour la synthèse. A chaque nouveau lot, il nous est nécessaire de procéder à une qualification du précurseur par un organisme extérieur (selon l'ANSM). Cet organisme réalise l'analyse sur le précurseur et le produit fini. Il s'agit de caractérisation structurale par RMN du proton, d'analyse HPLC-UV pour la quantification de la pureté du composé et la détermination de la masse exacte par spectrométrie de masse.
- Le contrôle de l'activité volumique en [^{18}F] dans les effluents gazeux. Au centre TEP, il est réalisé par la société ALGADE. Un prélèvement est réalisé en sortie des cheminées de ventilation des locaux du centre TEP, des enceintes de synthèse et de la casemate du cyclotron un jour de synthèse afin de vérifier la quantité de radioactivité rejetée dans l'air.
- Le contrôle de radioprotection externe effectué par la société DEKRA.

Nous avons déterminé les quantités de consommables utilisés pour une synthèse et ses contrôles qualités. Tous ces prix ont été collectés sur le logiciel de Gestion économique et financière du CHU : magh2® (Annexe 3) afin de faire correspondre chaque libellé avec un code du logiciel et un prix unitaire. Le petit matériel, à savoir les compresseurs, les gants et les champs stériles n'ont pas été comptabilisés.

IV.4.1.2.3 Dépenses de titre IV

Il s'agit des dépenses liées à l'amortissement des équipements de production. (Tableau 8)

L'équipement de production comprend le cyclotron, le module de synthèse associé à son logiciel de pilotage et l'enceinte blindée de mise en forme :

- Le cyclotron a été acheté en 1999, il est considéré à l'heure actuelle comme amorti. Nous avons pris en compte dans notre étude, le changement de l'amplificateur haute fréquence du cyclotron qui doit être remplacé durant l'année 2020.
- Le module de synthèse est également considéré comme amorti
- Le seul équipement neuf et récent que nous avons dû acquérir est l'enceinte de mise en forme.

IV.4.1.2.4 Charges LGG (Logistique et Gestion Générale)

Les charges LGG ont été obtenues auprès de la Direction des Affaires Financières (DAF). Elles intègrent les prestations des services supports à savoir le système informatique, la gestion du personnel, les syndicats, la garderie et crèche du personnel. Cette charge est égale à 21,9% du montant des dépenses des titres I à IV. (Tableau 8)

Il s'agit des dépenses liées à l'amortissement, obtenues par une requête analytique.

IV.4.1.2.5 Charge de structure

Les charges de structure immobilière et financière ont également été recueillies auprès de la DAF (Tableau 8). Cette charge est égale à 5,06% du montant des dépenses des titres I à IV.

IV.4.1.2.6 Dépense pour une expédition

L'expédition d'une dose de MRPE prend en compte le prix du trajet, le temps en personnel pour la mise en conformité lors du transport et l'achat du matériel pour le transport.

Le prix du trajet dépend du lieu de livraison. Le CHU a défini un marché avec une société spécialisée de transport de matières radioactives. De plus le personnel de la plateforme a dû être formé à l'envoi de matières dangereuses (dites classe 7 : matières radioactives par le règlement de transport routier appelé ADR), cette formation a coûté 1600 €.

Le CHU a également l'obligation de faire appel à un « conseiller classe 7 » afin de valider les process d'envoi de matières radioactives faite par le CHU. C'est une prestation externe qui n'a pas été comptabilisée ici car le conseiller classe 7 du CHU est aussi conseiller pour le transport d'autres matières dangereuses (déchets infectieux de soin notamment) et le cout de sa prestation est globalisé avec toutes les activités de transport provenant du CHU.

Le temps de rédaction des documents qualifiés pour l'expédition est estimé à 30 minutes avec la présence d'un PPH et d'un pharmacien pour effectuer cette étape avec un double contrôle. Il est nécessaire de remplir une déclaration d'expédition, une fiche d'enregistrement de chaque colis, une fiche d'enregistrement de contrôle du conditionnement secondaire et de l'expédition, le document de transport ADR, le bon de livraison et la lettre de voiture.

Pour le transport, il est nécessaire de posséder le matériel nécessaire au transport de la source radioactive : un pot plombé, un pot en polyéthylène et un pot de manutention.

IV.5 Résultats

IV.5.1 Bilan et activité prévisionnelle

Les couts affectés à la production de MRP sur la plateforme sont variables. Ils dépendent à la fois des contrats de maintenances des appareillages (qui peuvent subir des modifications conséquentes), de l'activité de production et de l'activité de R et D (Recherche et Développement). Plus l'activité globale est importante plus les couts sont importants en termes de consommable et de temps personnel.

Dans le tableau 6 ci-dessous, il y a les activités de la plateforme en nombre de patients pour les essais cliniques et en nombre de doses pour la recherche fondamentale. Il s'agit d'un bilan rétrospectif pour l'année 2018, ainsi que le bilan prévisionnel de l'activité prévue sur les 3 ans à venir.

Tableau 6 : Bilan du nombre de patients pour les essais cliniques et de doses pour la recherche fondamentale

Nom de l'essai	MRP	Nombre de patients	Examens à Tlse	Début	fin	2018	2019 prévisionnel	2020	2021
COMA 3D (monocentrique)	DPA	30 patients + 30 contrôles= 60	60	janv-18	juin-19	7	20	20	13
Infladep (multi :Tours/ Tlse/ Bdx/ Montpellier)	DPA	3 gpes de 20 sujets = 60	30	janv-18	janv-20	1	10	10	9
VIP (monocentrique)	DPA	40	80	juin-18	juin-20	2	30	30	20
dattep (multicentrique)	LBT	100	20	avr-18	oct-19	0	2	20	0
Glutatour (monocentrique)	FNM	15	15	avr-18	oct-19	0	8	7	0
UNITEP (monocentrique)	H2O	20	15	janv-18	oct-19	13	2	0	0
Montpellier Narcoglie	DPA	prestation	NA	janv-19	dec 2019	0	24	0	0
PIR2	chimie	prestation	200	janv-18	dec2020	10	90	100	0
[¹⁸ F]AV1451	AV1451	prestation	5	oct-19	oct-21		3	2	1
TOTAL						33	189	189	43

En orange et vert, il s'agit des prestations « essais cliniques » :

- Les essais cliniques actuellement ouverts sont surlignés en orange. A partir de 2018, une augmentation de l'activité de synthèse pour les essais cliniques a été entreprise avec six essais cliniques en cours pour un total de 224 patients sur la période étudiée. On considère qu'en moyenne une synthèse permet d'imager 2 patients, la prévision du nombre de synthèse a été calculée dans le tableau 7.
- Un essai clinique en prestation pour un CHU extérieur est surligné en vert. En effet, en 2019, la plateforme réalise des synthèses pour 24 patients du CHU de Montpellier dans le cadre de l'essai clinique NARCOGLIE.

En jaune et bleu, il s'agit de la recherche fondamentale :

- Le projet PiR2, qui est un partenariat du CHU avec l'INSERM pour une activité de recherche fondamentale est surligné en jaune. Le CHU s'est engagé à produire 200 doses de sur une période de 3 ans, de 2018 à 2020. Une fois produit, le [¹⁸F] est utilisé sur la plateforme de fluoration à des fins de recherche préclinique et fondamentale.
- Le projet de recherche fondamentale utilisant de l' [¹⁸F]-AV1451 est surligné en bleu. Il s'agit d'une étude pré-clinique chez des primates permettant d'étudier les mécanismes anatomiques impliquées dans la propagation de la pathologie Tau. Les animaux seront injectés avec de la protéine Tau hyperphosphorylée dans leur cortex entorhinal. Ils seront ensuite étudiés de manière longitudinale grâce à la réalisation de TEP utilisant un ligand spécifique de la protéine Tau : l' [¹⁸F]-AV1451. Il y a 6 examens TEP prévus par animal, répartis sur deux ans. Cela fait un total de 6 doses à réaliser qui permettront chacune d'injecter les 5 singes de l'étude.

Nous avons repris ces données et les avons intégrés dans un tableau qui récapitule les productions faites et à venir. Une ligne concernant les synthèses R et D a été ajoutée. Pendant les années 2016 et 2017, de nombreuses synthèses de mise en place et DME ont été constitués, pour les molécules suivantes : [¹⁸F]-DPA, , [¹⁸F]-FNM, [¹⁵O]-H₂O. L'estimation faite pour les années futures est de 15 par an mais elle pourra être revue en fonction des demandes et elle est difficile à anticiper. Cela correspond à la dernière ligne du Tableau 7 .

Tableau 7 : Bilan du nombre de synthèses pour les essais cliniques et la recherche fondamentale

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTAL
Nombre de synthèses TOTAL	34	13	45	158	152	30	432
Nombre de synthèses pour PiR2			10	90	100		200
Nombre de synthèses [¹⁸ F]AV1451 recherche fondamentale				3	2	1	6
Nombre de synthèses patients	0	0	16	50	35	14	115
Nombre de synthèses pour la R et D	34	13	19	15	15	15	111

Comme le montre la Figure 43, le nombre de synthèse le plus important est réalisé pour le projet PiR2 (46%). La même quantité de synthèse est réalisée pour la R et D et pour les essais cliniques (synthèses patients) avec respectivement 26% et 27% des synthèses sur la période de l'étude. Notre projet de l'[18F]-AV1451 représente quant à lui 1% des synthèses.

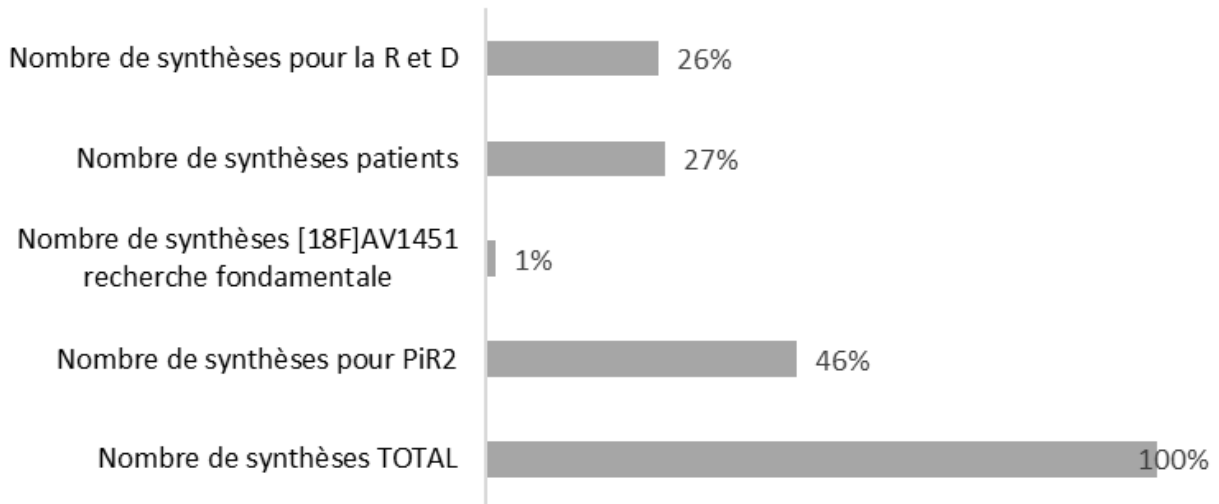


Figure 43 : Pourcentage représenté dans chaque typologie de synthèse sur les six ans de l'étude

IV.5.2 Détermination des coûts

IV.5.2.1 Montant global

Le Tableau 8 ci-après, permet de résumer l'ensemble des dépenses relatives à la plateforme sur une période de six ans en fonction du nombre de synthèses réalisées chaque année.

Tableau 8 : Montant global

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTAL cumulé sur 6 ans
Nombre de synthèses TOTAL	34	13	45	158	152	30	432
PIR2			10	90	100		
Nombre de tirs [¹⁸ F]AV1451 recherche fondamentale				3	2	1	
Nombre de tirs patients	0	0	16	50	35	14	115
Nombre de tirs pour R et D	34	13	19	15	15	15	
Titre 1							
PH cyclotroniste	24 252,32 €	18 452,85 €	30 051,79 €	93 318,72 €	95 954,84 €	28 470,12 €	
AHU	2 320,52 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €	
Total Personnel médical	26 572,85 €	32 376,00 €	43 974,94 €	107 241,87 €	109 877,99 €	42 393,26 €	
PPH			9 832,27 €	36 112,07 €	37 199,51 €	9 197,93 €	
Total personnel non médical			9 832,27 €	36 112,07 €	37 199,51 €	9 197,93 €	
TOTAL Titre 1	26 572,85 €	32 376,00 €	53 807,21 €	143 353,94 €	147 077,50 €	51 591,19 €	454 778,68 €
Titre 2							
Consommables préparation	6 120,00 €	2 340,00 €	8 100,00 €	28 440,00 €	27 360,00 €	5 400,00 €	
Consommables du contrôle qualité	3 891,30 €	1 487,85 €	5 150,25 €	18 083,10 €	17 396,40 €	3 433,50 €	
Maintenance cyclotron	93 357,00 €	63 264,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	
Changement des pièces automate	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	
Contrôle qualité lot précurseur	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	
Contrôle des effluents gazeux	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	
Contrôle de radioprotection externe	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	
TOTAL Titre 2	110 044,30 €	73 767,85 €	53 426,25 €	86 699,10 €	84 932,40 €	49 009,50 €	457 879,40 €
Titre 4							
Matériel: Amortissement de l'enceinte			9 108,00 €	9 108,00 €	9 108,00 €	9 108,00 €	
Changement ampli haute fréquence en 2020					25 714,00 €	25 714,00 €	
Maintenance enceinte et micro DDSA (66% de 2000€)			1 320,00 €	1 320,00 €	1 320,00 €	1 320,00 €	
TOTAL Titre 4	0,00 €	0,00 €	10 428,00 €	10 428,00 €	36 142,00 €	36 142,00 €	93 140,00 €
Total des charges directes	136 617,15 €	106 143,85 €	117 661,46 €	240 481,04 €	268 151,90 €	136 742,69 €	
Charges LGG et 26%	35 520,46 €	27 597,40 €	30 591,98 €	62 525,07 €	69 719,49 €	35 553,10 €	261 507,50 €
Total	172 137,60 €	133 741,25 €	148 253,44 €	303 006,10 €	337 871,39 €	172 295,79 €	1 267 305,58 €

Sur la Figure 44, l'évolution des coûts de chaque titre selon l'année permet d'apprécier l'augmentation du titre 1 et du coût total parallèlement au nombre de synthèses. On peut constater que le coût par années est très variable en fonction du nombre de synthèses réalisées.

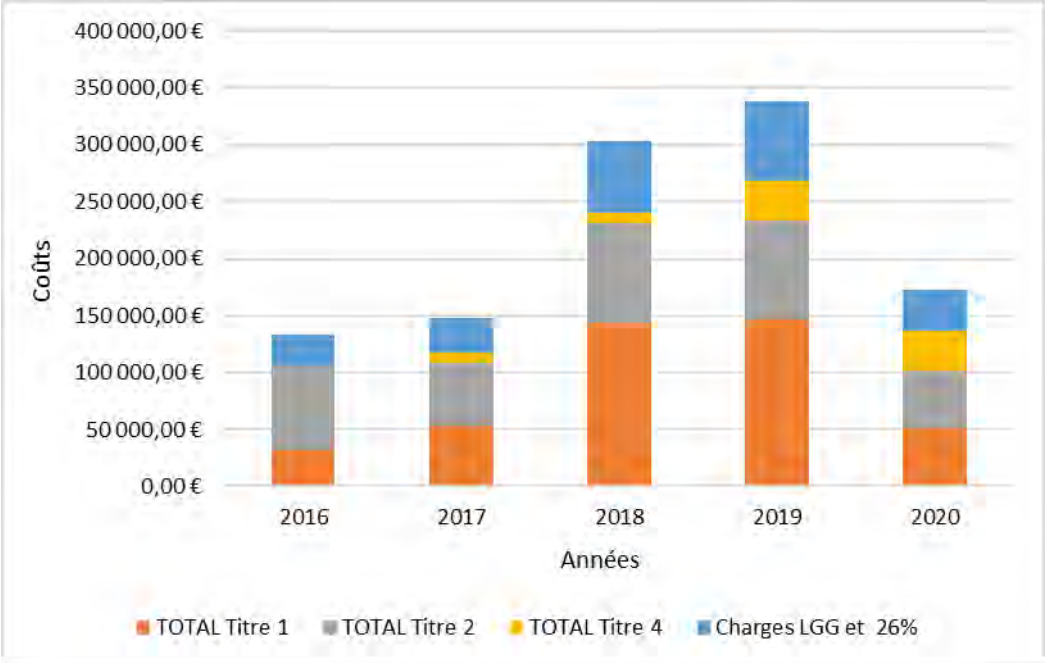


Figure 44 : Evolution des coûts de chaque titre par années

Nous nous sommes intéressés à la part de chaque titre dans l'enveloppe totale. Ces résultats sont représentés sur la Figure 45. La part la plus élevée de dépenses correspond au titre 1 (35,80%) et au titre 2 (36,5%).

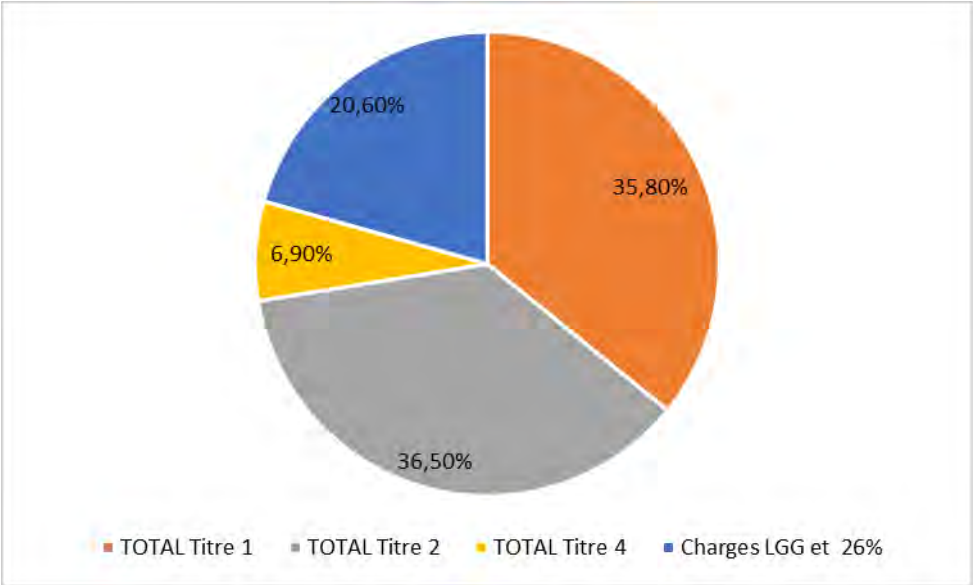


Figure 45 : Représentation de chaque dépense dans l'enveloppe totale

Nous allons détailler les résultats de chaque titre.

IV.5.2.2 Détail des montants du titre I

Nous avons admis qu'une synthèse se déroule sur une journée de 7 heures :

- Temps de mise en place et de préparation de l'enceinte et du cyclotron : 3 heures
- Temps de synthèse : 2 heures
- Temps pour les contrôles qualité : 30 minutes
- Qualité, traçabilité, entretien du matériel et gestion des consommables : 1,5 heures

Le PH présent sur la plateforme remplit plusieurs fonctions : CAMARISTE, PCR et radiopharmacien. Nous avons considéré que le temps imparti à la fonction de PCR s'effectue sur une journée par mois soit un total de 12 jours par an. Son activité de radiopharmacien et de CAMARISTE est exercée les jours de synthèse.

L'AHU est affectée sur 30% de son temps sur l'activité de la plateforme pour participer aux synthèses mais également sur d'autres missions de fond comme la rédaction des DME, des missions de continuité du service, de recherche et d'investigation TEP.

Depuis mi-2018, un PPH est affecté sur la plateforme de fluoration. Il est présent les jours de synthèses sur la plateforme.

Pour l'évaluation des coûts de personnel, les salaires correspondent à l'échelon 8 de la grille indiciaire de la fonction publique hospitalière.

Tableau 9 : Détail des montants du titre I

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021
PH cyclotroniste						
nombre de jours / an	46	35	57	177	182	54
ETP	22,22%	16,91%	27,54%	85,51%	87,92%	26,09%
109 135,45 €	24 252,32 €	18 452,85 €	30 051,79 €	93 318,72 €	95 954,84 €	28 470,12 €
AHU						
ETP	5,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%
46 410,49 €	2 320,52 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €	13 923,15 €
PPH						
nombre de jours / an			45	165	170	42
ETP			21,70%	79,70%	82,10%	20,30%
45 310,00 €			9 832,27 €	36 112,07 €	37 199,51 €	9 197,93 €

IV.5.2.3 Détail des montants du titre II

Les coûts liés à la préparation et au contrôle des MRP comprennent les consommables au prorata du nombre de synthèses réalisées.

Concernant le cyclotron, deux maintenances annuelles sont comprises dans le contrat de maintenance préventive. Nous n'avons jamais eu à faire pour l'instant de maintenance curative en urgence. Une diminution de ce coût est observée en 2018 grâce au changement du contrat de maintenance du cyclotron.

L'enceinte de mise en forme a été achetée par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), mais elle est essentiellement utilisée pour des productions pour le CHU. A ce titre-là, la maintenance représente 66% du montant de la maintenance annuelle de cette enceinte qui est de 2000€. Le reste est assuré par l'INSERM.

Tableau 10 : Détail des montants du titre II

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Titre 2							
Consommables préparation	6 120,00 €	2 340,00 €	8 100,00 €	28 440,00 €	27 360,00 €	5 400,00 €	
Consommables du contrôle qualité	3 891,30 €	1 487,85 €	5 150,25 €	18 083,10 €	17 396,40 €	3 433,50 €	
Maintenance cyclotron	93 357,00 €	63 264,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	33 500,00 €	
Maintenance enceinte et micro DDSA (66% de 2000€)			1 320,00 €	1 320,00 €	1 320,00 €	1 320,00 €	
Changement des pièces automate	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	3 000,00 €	
Contrôle qualité lot précurseur	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	1 176,00 €	
Contrôle des effluents gazeux	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	1 200,00 €	
Contrôle de radioprotection externe	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	1 300,00 €	
TOTAL Titre 2	110 044,30 €	73 767,85 €	54 746,25 €	88 019,10 €	86 252,40 €	50 329,50 €	463 159,40 €

IV.5.2.4 Détail des montants du titre IV

Pour l'enceinte de mise en forme, l'amortissement représente également 66% de son prix d'achat qui est de 120 000€. Pour une répartition annuelle, cela correspond à 12% de l'amortissement par an. Nous avons également pris en compte dans notre étude, le changement de l'amplificateur haute fréquence du cyclotron (180k€) qui doit être remplacé durant l'année 2020 avec un amortissement sur sept ans.

Tableau 11 : Détail des montants du titre IV

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Titre 4							
Matériel: Amortissement de l'enceinte			9 108,00 €	9 108,00 €	9 108,00 €	9 108,00 €	
Changement ampli haute fréquence en 2020					25 714,00 €	25 714,00 €	
TOTAL Titre 4	0,00 €	0,00 €	9 108,00 €	9 108,00 €	34 822,00 €	34 822,00 €	87 860,00 €

IV.5.3 Coût moyen pour une synthèse

Le Tableau 8 regroupe l'ensemble des coûts de production et de contrôle pour les 432 synthèses de MRP. En rapportant le coût de fonctionnement total au nombre de synthèses réalisées sur les six années, le coût moyen d'une synthèse sur notre plateforme de fluoration est de 4754,83€. Cependant, en observant le Tableau 12, nous pouvons constater que le coût moyen d'une synthèse est très variable selon les années : de 1917,76€ en 2018 à 10 287,79€ en 2017.

Tableau 12 : Coût moyen d'une synthèse selon les dépenses annuelles

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTAL cumulé sur six ans
Nombre de synthèses TOTAL	34	13	45	158	152	30	
Total annuel des dépenses	172 137,60 €	133 741,25 €	148 253,44 €	303 006,10 €	337 871,39 €	172 295,79 €	1 267 305,58 €
Coût moyen d'une synthèse	5 062,87 €	10 287,79 €	3 294,52 €	1 917,76 €	2 222,84 €	5 743,19 €	4 754,83 €

Afin d'être au plus juste dans le prix d'une synthèse à proposer, nous avons calculé en fonction du prix moyen de la synthèse chaque année :

- Le coût annuel engendré par les synthèses de mise en place de développement de méthode.
- Le coût annuel des synthèses pour les essais cliniques et la recherche fondamentale.

(Tableau 13)

Tableau 13 : Détails des coûts : recherche et mise en place / essais clinique et recherche fondamentale

Année	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTAL
Recherche et mise en place							
Nombre de synthèse	34	13	19	15	15	15	111
Coût moyen de la synthèse pour l'année	5 062,87 €	10 287,79 €	3 294,52 €	1 852,14 €	2 026,76 €	4 503,46 €	
Coût total Recherche et mise en place	172 137,60 €	133 741,25 €	62 595,90 €	27 782,10 €	30 401,43 €	67 551,87 €	494 210,15 €
Essais cliniques et recherche fondamentale							
Nombre de synthèses			26	143	137	15	321
Coût moyen de la synthèse pour l'année	5 062,87 €	10 287,79 €	3 294,52 €	1 852,14 €	2 026,76 €	4 503,46 €	
Coût total essais cliniques et recherche fondamentale	0,00 €	0,00 €	85 657,54 €	264 856,07 €	277 666,37 €	67 551,87 €	695 731,85 €

Sur une période de six ans, 111 synthèses de mise en place et de recherche ont été réalisées. Cela représente un montant total de 494 210,15€ qu'il faut répercuter dans le prix d'une synthèse à destination d'un patient ou pour la recherche fondamentale. Pour cela, nous avons tenu compte du coût total de l'ensemble des tirs confondus que nous avons rapporté au nombre de synthèses pour les essais cliniques ou la recherche fondamentale. Cela nous permet d'obtenir un prix de 3706,98€ pour une synthèse. (Tableau 14)

Nous avons également effectué la même méthode de calcul en considérant des périodes plus restreintes, à savoir de 2017 à 2020 et de 2018 à 2020 pour un coût moyen de synthèse de 2884,64€ et 2447,58€ respectivement.

Tableau 14 : Bilan du coût moyen d'une synthèse selon la période considérée

Période	Coût total des tirs de recherche et mise en place	Coût total des tirs essais clinique et recherche fondamentale	Coût moyen d'une synthèse
2016-2021	494 210,15 €	695 731,85 €	3 706,98 €
2017-2020	254 520,68 €	628 179,98 €	2 884,64 €
2018-2020	120 779,43 €	628 179,98 €	2 447,58 €

IV.5.3.1 Coût pour un essai clinique institutionnel

Pour un essai clinique institutionnel, le coût d'une synthèse de MRP est compris entre 2 447,58€ et 3 706,98€ selon la période prise en compte dans notre étude. Ce coût permet de prendre en compte les différents tests de mise en place effectués sur la plateforme et les DME qui ont dû être constitués auparavant.

IV.5.3.2 Coût pour la recherche fondamentale : [¹⁸F] -AV1451

Pour la recherche fondamentale, il n'est pas utile de faire les contrôles qualités. Il faut donc les soustraire au coût d'une synthèse pour un essai clinique institutionnel. Cela représente un montant de 168,28€ par synthèse. Ce montant inclus les consommables et les tests de stérilité et d'endotoxines qui sont sous-traités au laboratoire.

Le prix à proposer pour la recherche fondamentale varie entre 2 279,30€ et 3 538,7€ par synthèse selon la période de l'étude considérée.

IV.5.3.3 Coût pour une production de [¹⁸F] pour le projet PiR2

Le prix est différent d'une synthèse de MRP puisqu'il est nécessaire d'avoir uniquement du fluor. Le temps de production est plus court, nous prendrons une durée de trois heures. De plus, lors de ces productions de [¹⁸F], le PPH est financé par PiR2.

Ainsi, au coût de la synthèse pour un essai clinique institutionnel, il faut soustraire :

- Le coût du PPH : 218,5€ sur la journée
- Le coût du PH sur le reste de la journée (on ne prend en compte que son temps de présence pour la synthèse soit trois heures) : 302€
- Le coût de la synthèse : 60€ de consommables
- Le coût des contrôles qualité : 168,28€

Le total à soustraire est de 748,78€ par synthèse. Ainsi, le coût d'une production de [¹⁸F] est estimée entre 1 698,8 € et 2 958,2€ selon la période retenue.

Tableau 15 : Bilan des coûts de production pour les différents clients selon la période considérée

Période	Coût total des tirs de recherche et mise en place	Coût total des tirs essais clinique et recherche fondamentale	Coût moyen d'une synthèse d'essai clinique	Coût moyen d'une synthèse pour la recherche fondamentale	Coût moyen de production de fluor pour PiR2
2016-2021	494 210,15 €	695 731,85 €	3 706,98 €	3 538,70 €	2 958,20 €
2017-2020	254 520,68 €	628 179,98 €	2 884,64 €	2 716,36 €	2 135,86 €
2018-2020	120 779,43 €	628 179,98 €	2 447,58 €	2 279,30 €	1 698,80 €

IV.6 Discussion

IV.6.1 Interprétation des résultats

Le coût d'une synthèse a été établi à partir du nombre total de synthèses réalisées, pour amortir les investissements de matériel, les maintenances et le changement des pièces onéreuses. L'investissement humain est directement relié au nombre de synthèses réalisées. Une durée d'étude de six ans a été nécessaire de manière à prendre en compte la longue période de recherche et de rédaction du DME nécessaire avant de pouvoir utiliser la molécule en routine dans la recherche fondamentale et les essais cliniques par la suite.

Lors des synthèses pour les DME ou pour les tests de mise en place de nouvelles synthèses, la plateforme ne reçoit aucune recette. Nous avons répercuté les coûts de ces synthèses sur le prix actuel à proposer pour une synthèse. Avec cette méthode de répartition des coûts sur six ans, nous obtenons un coût de 3 706,98€ pour une synthèse (Tableau 14).

Ce coût est très élevé en comparaison à la facturation effectuée actuellement (Tableau 16)

En effet, à l'heure actuelle, pour le projet PiR₂, il y a une facturation de 1000€ par synthèse de [¹⁸F] effectuée.

Pour les essais cliniques il s'agit d'un tarif par patient :

- pour la prestation de synthèse de MRP pour le CHU de Montpellier dans le cadre de l'étude NARCOGLIE, il y a une facturation de 1 000€ par patients et nous expédions deux doses avec une synthèse.
- pour les autres essais cliniques, la facturation pour chaque patient varie de 550€ à 1 000€.

Tableau 16 : Tarif de facturation des doses

Nom de l'essai	MRP	Budget/patient
COMA 3D (monocentrique)	DPA	550,00 €
Infladep (multi :Tours/ Tlse/ Bdx/ Montpellier)	DPA	550,00 €
VIP (monocentrique)	DPA	550,00 €
dattep (multicentrique)	LBT	1 000,00 €
Glutatour (monocentrique)	FNM	1 000,00 €
UNITEP (monocentrique)	H20	1 333,33 €
Montpellier Narcogle	DPA	1 000,00 €
PIR2	chimie	1 000,00 €

Comme vu précédemment (Tableau 15), selon la période considérée, le coût obtenu pour une synthèse est différent. En considérant une période de six ans, le coût est très élevé, c'est le cas le plus péjoratif.

En l'absence de référentiel sur la méthode à utiliser, nous avons fait le choix de retenir les coûts obtenus en considérant la période de trois ans entre 2018 et 2020 pour plusieurs raisons :

- En 2016 et 2017, le prix de la dose est très élevé (respectivement 5 062,87€ et 10 287,70€). Durant ces années, ce sont uniquement des synthèses de mise en place et de constitution de DME qui sont réalisées, c'est-à-dire que le CHU ne perçoit aucune recette. De plus, à cette période, la maintenance du cyclotron est très élevée, notre personnel n'ayant pas encore pu être formé pour les petites défaillances.
- L'année 2021 ne va pas être prise en compte car il est difficile à l'heure actuelle d'avoir une vision exacte des essais cliniques ou des demandes de recherche fondamentale qui vont nous être formulées. Il est difficile de faire du prévisionnel à deux ans sur cette activité de synthèse qui est fluctuante et qui ne dépend pas de notre plateforme.

Le coût obtenu en considérant les six années n'est pas acceptable pour de la recherche fondamentale ou pour les investigateurs des essais cliniques. Nous avons fait le choix de ne pas répercuter certaines des dépenses afin d'avoir un prix raisonnable à proposer et pour des raisons d'accessibilité à la recherche. Ainsi, avec la méthode d'étude de coût sur les années 2018 à 2020, le CHU a réalisé un investissement très important avec une partie de perte. Nous pouvons considérer qu'entre les années 2016 et 2017, l'institution a investi 305 878€ pour la plateforme.

Une synthèse permet la production de 2 à 4 doses patients de MRP pour les essais cliniques. Si un transport est nécessaire, la production sera de 2 doses car il faut considérer la décroissance

radioactive rapide du [^{18}F]. Pour les patients sont injectés au CHU de Toulouse, une production de 4 doses est possible avec une synthèse.

Ainsi, pour les essais cliniques, il semble nécessaire d'imposer des contraintes aux investigateurs comme par exemple le regroupement de plusieurs rendez-vous patients le même jour afin de couvrir nos coûts. Si le respect d'un tel planning n'est pas possible, la dose sera alors plus chère. En effet pour un coût de synthèse de 2 447,58€, s'il y a 4 patients la même journée, cela génère un coût de 611,9€ par patient. S'il n'y a que 2 patients, le prix de la dose sera de 1223,8€ par patients.

Pour la recherche fondamentale, nous pouvons facilement fixer un coût fixe par tir de [^{18}F] et synthèse de MRPE. Ensuite, il est possible pour le client d'utiliser cette production pour plusieurs expérimentations.

Cette étude économique sur l' [^{18}F]-AV1451 est un exemple et est valable pour les autres traceurs qui sont synthétisés sur notre plateforme. En effet, les modes opératoires de synthèses sont différents mais le personnel, le matériel et le temps nécessaire sont similaires pour les autres synthèses.

IV.6.2 Limites de l'étude

Cependant, plusieurs limites à notre étude ont pu être identifiées.

Tout d'abord, il s'agit d'une étude sur les six dernières années, qui ne tient pas compte de l'investissement matériel initial nécessaire. Par exemple le cyclotron et le module de synthèse sont considérés comme amortis. La construction et la mise aux normes des locaux par l'institution n'est également pas prise en compte.

De plus, nous ne sommes pas en capacité actuellement d'évaluer le coût de reprise des déchets de la plateforme par l'ANDRA lorsque cela sera nécessaire. Pour le moment ils sont stockés dans un local spécifique et nous avons donc négligé cette dépense dans notre étude.

D'autre part, nous nous basons sur un planning prévisionnel afin d'établir le prix d'une synthèse. Si pour diverses raisons, le nombre de patients ou de synthèses initialement prévus vient à diminuer, se pose alors le problème de la répartition des frais sur les autres synthèses. En pratique cela ne sera pas réalisable et la plateforme sera alors en fort déficit.

A l'inverse, si plus de patients sont recrutés ou si nous recevons davantage de demande que prévu, pour de la recherche fondamentale, cela permettra de constituer un fond budgétaire à la plateforme.

L' [¹⁸F]-AV1451 permet d'illustrer cette situation fluctuante dont nous sommes dépendants. En effet nous avons eu une demande de la part d'un industriel pour la constitution du DME de l' [¹⁸F]-AV1451 et la production de 200 doses pour l'homme dans le cadre d'un essai clinique. Une fois toutes ces démarches et mise en place effectuées, l'industriel s'est désengagé et n'a plus souhaité faire appel à nous pour une production par un centre académique. Pour pallier à ces aléas, ce genre de structure de recherche nécessite un soutien indispensable de l'institution.

Dans cette étude financière, il est relativement difficile d'évaluer et de prendre en compte la valorisation SIGAPS provenant des publications de l'équipe cyclotron (on peut déjà considérer qu'il y a eu 50 articles publiés depuis 2017 grâce à la plateforme) mais aussi des investigateurs CHU qui publient grâce à des données obtenues à l'aide des radiotraceurs synthétisés sur la plateforme. Cependant, il s'agit d'un élément très important car il y a une réelle volonté de l'institution d'être un pôle d'excellence.

Ainsi, même si la facturation des doses des essais cliniques pour le CHU de Toulouse apparaît relativement basse, la valorisation de cette activité pour le CHU ne va pas s'exercer en termes de rentabilité, mais préférentiellement en termes de publications scientifiques.

Contrairement à une industrie pharmaceutique, cette activité ne peut pas être rentable. En effet, nos potentiels clients ont un budget restreint à allouer à la radiopharmacie pour réaliser leurs projets de recherche. Si nous voulons que la plateforme continue de fonctionner, nous sommes contraints d'appliquer un mode de calcul nous permettant d'obtenir un prix relativement bas avec un investissement initial et continu de la part de l'institution. En recherche biomédicale comme dans d'autres secteurs scientifiques, la qualité de la recherche est intrinsèquement liée aux performances des équipements et des plates-formes technologiques. L'aptitude à réaliser une avancée scientifique majeure repose fortement sur la capacité à recourir à ces technologies de pointe. À cet égard, le CHU de Toulouse a permis la mise en place d'un outil de production de MRP qui est mis à la disposition des investigateurs du CHU et des chercheurs de l'INSERM afin de maintenir un niveau international de recherche.

IV.6.3 Perspectives

Il existe peu de données dans la littérature sur les coûts de production des MRPE produits par une plateforme institutionnelle. Cependant nous avons pu comparer nos résultats avec une étude réalisée par les affaires financière du CHU et également avec le prix pratiqué par les industriels.

Les financiers de notre établissement avaient également réalisé une étude de coût, au vu du budget investi dans notre unité et des recettes qui n'étaient pas en conséquence. Ils ont trouvé un coût de 2 800€ par tir. Cependant ils n'ont pas pris en compte dans leur étude la totalité des consommables de la production et des contrôles qualités du produit final et des précurseurs, le contrôle annuel des effluents gazeux ou de radioprotection externe.

La comparaison du prix d'une synthèse retrouvée dans notre étude montre également une certaine similitude avec le prix pratiqué par les industries et par un centre hospitalier possédant un cyclotron. Cependant, notre coût théorique reste supérieur. En effet, la dose d' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 est facturée entre 2000 et 3000€ par l'industriel. Un autre centre hospitalier français produit du $[^{18}\text{F}]$ -DPA au prix de 2000€ la dose (sans le transport) pour un patient. Cependant, notre calcul de coût théorique reste supérieur pour notre production. Il serait intéressant de connaître leur méthodologie de calcul pour le prix de la dose en rapport avec leurs équipements, contrats de maintenance, ainsi que leur organisation pour pouvoir accéder à ce tarif.

Concernant spécifiquement l'AV1451, l'accès à ce MRP est compliqué sur Toulouse. Le site de production le plus proche se trouve à Amsterdam et compte tenu de la décroissance rapide du Fluor, un transport rapide est nécessaire. Le seul possible est l'avion et son coût est de 10 000€ environ. Ce coût est beaucoup trop élevé pour pouvoir être inclus dans un essai clinique ou de la recherche fondamentale au vu des budgets disponible. C'est dans ce contexte que nous recevons des demandes de synthèse de ce MRPE pour la recherche fondamentale. Cependant, l'industriel a déposé un brevet sur l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451. Nous ne pouvons pas le produire pour une administration à l'homme sans son accord. Cet industriel nous autorise uniquement à le produire pour de la recherche fondamentale à l'heure actuelle.

Au vu de l'investissement humain et financiers de ces dernières années, le but de la plateforme du CHU de Toulouse est de produire des molécules radiomarquées à visée de recherche, qu'elle soit clinique, préclinique ou cellulaire.

Les prix proposés dans notre étude sont applicables dans le cas où la molécule radiomarquée est disponible au CHU de Toulouse. Si ce n'est pas le cas, il faudra ajouter au prix de la synthèse, un forfait de chimie et de mise au point réalisée par notre équipe et non évalué dans notre étude. Il sera intéressant d'évaluer ce coût pour élargir nos potentiels clients.

L'accès aux MRPE reste difficile pour les centres TEP ne disposant pas d'un centre de production. Ils peuvent participer à des protocoles de recherche avec des molécules fluorées mais en étant tributaire de l'engagement d'un industriel ou d'une plateforme institutionnelle pour leur approvisionnement.

Conclusion

La maladie d'Alzheimer se définit par la présence de protéines amyloïdes et d'agrégats de protéine tau hyperphosphorylée dans le cerveau des patients. Des MRPE tels que l'AV1451 peuvent nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie.

Sur la plateforme de fluoration nous avons les moyens de produire des MRPE pour des essais cliniques ou de la recherche fondamentale. Devant l'augmentation des demandes ces dernières années, il est devenu nécessaire de faire une évaluation précise de la faisabilité des demandes que nous recevons et une étude de coût afin de proposer le tarif le plus juste possible.

En l'absence de méthode consensuelle disponible dans la littérature, la construction de notre outil Excel® permettra une actualisation simplifiée du coût théorique de la dose en fonction des investissements, de l'évolution des prix des consommables et des maintenances des équipements. Pour établir ces coûts, nous avons retenu une méthode de coûts complète.

Un autofinancement total ne sera jamais atteint, mais il est nécessaire d'avoir une génération de recettes pour que la plateforme puisse perdurer. En mutualisant cet outil pour la recherche clinique et pour la recherche fondamentale, nous espérons trouver un équilibre financier à moyen terme et une valorisation importante du CHU en termes de publication.

Au-delà de l'intérêt financier pour l'établissement, cette étude permet d'avoir une vision transversale du fonctionnement de la plateforme et de guider la réflexion lors des choix futurs.

Références bibliographiques

1. Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 25 oct 1977;116(2):207-25.
2. Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* janv 1985;17(1):89-96.
3. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res.* 1 déc 1986;1(3):271-80.
4. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 1989;8(2):393-9.
5. Luo M, Tse S-W, Memmott J, Andreadis A. Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J Neurochem.* 2004;90(2):340-51.
6. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. These authors contributed equally to this work. *Brain Res Rev.* 1 août 2000;33(1):95-130.
7. Butner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol.* 1 nov 1991;115(3):717-30.
8. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 1 oct 1988;107(4):1449-59.
9. Mohan R, John A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules: ROLE OF MAPs IN THE ACTIN-MICROTUBULE NETWORK. *IUBMB Life.* juin 2015;67(6):395-403.
10. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Riczny J, Ripova D. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease.* 2012.
11. Elie A, Prezel E, Guérin C, Denarier E, Ramirez-Rios S, Serre L, et al. Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci Rep.* 5 mai 2015;5:9964.
12. Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K, Nixon RA. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 13 févr 2008;28(7):1682-7.
13. Goldstein LS, Das U. Chapter 12 - Neurodegenerative Diseases and Axonal Transport. In: Wolfe MS, éditeur. *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases* [Internet]. Academic Press; 2018 p. 345-67. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128113042000122>

14. Mondragón-Rodríguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, García-Sierra F. Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34(1):62-75.
15. Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci.* 15 mai 2006;119(Pt 10):2025-34.
16. Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, et al. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem.* 11 févr 2011;286(6):4566-75.
17. Fontaine SN, Sabbagh JJ, Baker J, Martinez-Licha CR, Darling A, Dickey CA. Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cell Mol Life Sci.* 1 mai 2015;72(10):1863-79.
18. Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen S-H. Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Mol Brain Res.* 18 août 2005;138(2):135-44.
19. Kins S, Cramer A, Evans DRH, Hemmings BA, Nitsch RM. Reduced Protein Phosphatase 2A Activity Induces Hyperphosphorylation and Altered Compartmentalization of Tau in Transgenic Mice. :9.
20. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, et al. Molecular Interactions among Protein Phosphatase 2A, Tau, and Microtubules: IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF TAU PHOSPHORYLATION AND THE DEVELOPMENT OF TAUOPATHIES. *J Biol Chem.* 3 sept 1999;274(36):25490-8.
21. Gong C-X, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of Microtubule-associated Protein Tau Is Regulated by Protein Phosphatase 2A in Mammalian Brain: IMPLICATIONS FOR NEUROFIBRILLARY DEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE. *J Biol Chem.* 25 févr 2000;275(8):5535-44.
22. Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. The Emerging Link between O-GlcNAc and Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* 12 déc 2014;289(50):34472-81.
23. Gong C-X, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 27 oct 2004;112(6):813-38.
24. Kamemura K, Hart GW. Dynamic Interplay between O-Glycosylation and O-Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins: A New Paradigm for Metabolic Control of Signal Transduction and Transcription. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2003 [cité 27 avr 2019]. p. 107-36. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660303010043>
25. Haque MM, Kim D, Yu YH, Lim S, Kim DJ, Chang Y-T, et al. Inhibition of tau aggregation by a rosamine derivative that blocks tau intermolecular disulfide cross-linking. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis.* sept 2014;21(3):185-90.
26. Xu S, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Characterization of tau fibrillization in vitro. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* mars 2010;6(2):110-7.

27. Ramachandran G, Udgaonkar JB. Mechanistic Studies Unravel the Complexity Inherent in Tau Aggregation Leading to Alzheimer's Disease and the Tauopathies. *Biochemistry*. 18 juin 2013;52(24):4107-26.
28. Luna-Muñoz J, Harrington CR, Wischik CM, Flores-Rodríguez P, Avila J, Zamudio SR, et al. Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease. *Underst Alzheimers Dis* [Internet]. 27 févr 2013 [cité 26 juin 2019]; Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/understanding-alzheimer-s-disease/phosphorylation-of-tau-protein-associated-as-a-protective-mechanism-in-the-presence-of-toxic-c-termi>
29. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. juill 2011;475(7356):324-32.
30. Kopito RR, Sitia R. Aggresomes and Russell bodies: Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep*. 1 sept 2000;1(3):225-31.
31. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 5 mai 1986;261(13):6084-9.
32. Buée-Scherrer V, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett*. 2002;515(1-3):151-4.
33. Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 janv 2005;102(1):227-31.
34. Kopeikina KJ, Hyman BT, Spires-Jones TL. Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Transl Neurosci*. sept 2012;3(3):223-33.
35. Medina M, Avila J. The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 [cité 27 avr 2019];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00113/full>
36. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*. juill 2009;11(7):909-13.
37. world-alzheimer-report-2015-summary-sheet-french.pdf [Internet]. [cité 2 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.alz.co.uk/sites/default/files/pdfs/world-alzheimer-report-2015-summary-sheet-french.pdf>
38. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 25 juin 2002;58(12):1791-800.
39. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med*. 5 juin 1980;302(23):1283-92.
40. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med*. 12 juin 1980;302(24):1333-43.

41. Zhang C. Natural Compounds That Modulate BACE1-processing of Amyloid-beta Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Discov Med.* 25 sept 2012;14(76):189-97.
42. Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest.* nov 2002;110(10):1375-81.
43. Checler F, Buée L. Données fondamentales sur les pathologies amyloïde et Tau dans la maladie d'Alzheimer : quelles perspectives thérapeutiques ? *Ann Pharm Fr.* 1 mars 2009;67(2):136-53.
44. Braak H, Braak E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 1 mai 1995;16(3):271-8.
45. Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, et al. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 9 nov 2010;107(45):19561-6.
46. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA, et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18 F-DPA-714 PET imaging. *Brain.* 1 avr 2016;139(4):1252-64.
47. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* oct 1991;12(10):383-8.
48. Delacourte A. The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD.* 2006;9(3 Suppl):187-94.
49. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepijan SV, Chafai M, Kootar S, et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* 15 oct 2015;526(7573):443-7.
50. Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Pérez JM, Evans AC. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun [Internet].* 21 juin 2016 [cité 2 juin 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4919512/>
51. Brier MR, Gordon B, Friedrichsen K, McCarthy J, Stern A, Christensen J, et al. Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med.* 11 mai 2016;8(338):338ra66.
52. Mirbaha H, Chen D, Morazova OA, Ruff KM, Sharma AM, Liu X, et al. Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *eLife [Internet].* 2018 [cité 2 juin 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6039173/>
53. Vijaya Kumar DK, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, et al. Amyloid- β Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease. *Sci Transl Med.* 25 mai 2016;8(340):340ra72.
54. Eimer WA, Vijaya Kumar DK, Shanmugam NKN, Rodriguez AS, Mitchell T, Washicosky KJ, et al. Alzheimer's Disease-Associated β -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron.* 11 juill 2018;99(1):56-63.e3.

55. Flamier A, El Hajjar J, Adjaye J, Fernandes KJ, Abdouh M, Bernier G. Modeling Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease through BMI1 Deficiency. *Cell Rep.* 29 mai 2018;23(9):2653-66.
56. Mastroeni D, Nolz J, Khmour OM, Sekar S, Delvaux E, Cuyugan L, et al. Oligomeric amyloid β preferentially targets neuronal and not glial mitochondrial-encoded mRNAs. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* 2018;14(6):775-86.
57. Sorrentino V, Romani M, Mouchiroud L, Beck JS, Zhang H, D'Amico D, et al. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature.* 14 déc 2017;552(7684):187-93.
58. Marciniak E, Leboucher A, Caron E, Ahmed T, Tailleux A, Dumont J, et al. Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J Exp Med.* 7 août 2017;214(8):2257-69.
59. Poirel O, Mella S, Videau C, Ramet L, Davoli MA, Herzog E, et al. Moderate decline in select synaptic markers in the prefrontal cortex (BA9) of patients with Alzheimer's disease at various cognitive stages. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):938.
60. Rosa-Neto P. La recherche a montré que la tomographie par émission de positons (TEP) aide les spécialistes à établir le diagnostic précoce et le diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer (MA). Les Drs Rosa-Neto et Leuzy expliquent comment la TEP apporte de l'information essentielle sur divers aspects de la physiologie du cerveau altérées par la démence. :8.
61. Jack CR, Wiste HJ, Vemuri P, Weigand SD, Senjem ML, Zeng G, et al. Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain.* 1 nov 2010;133(11):3336-48.
62. Hatashita S, Yamasaki H. Clinically Different Stages of Alzheimer's Disease Associated by Amyloid Deposition with [11C]-PIB PET Imaging. *J Alzheimers Dis.* 2 sept 2010;21(3):995-1003.
63. Payoux P, Salabert AS. New PET markers for the diagnosis of dementia: *Curr Opin Neurol.* déc 2017;30(6):608-16.
64. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, et al. Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 8 mai 2001;56(9):1143-53.
65. Newberg AB, Arnold SE, Wintering N, Rovner BW, Alavi A. Initial Clinical Comparison of 18F-Florbetapir and 18F-FDG PET in Patients with Alzheimer Disease and Controls. *J Nucl Med.* 1 juin 2012;53(6):902-7.
66. Barthel H, Luthardt J, Becker G, Patt M, Hammerstein E, Hartwig K, et al. Individualized quantification of brain β -amyloid burden: results of a proof of mechanism phase 0 florbetaben PET trial in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* sept 2011;38(9):1702-14.

67. Jung Y, Whitwell JL, Duffy JR, Strand EA, Machulda MM, Senjem ML, et al. Regional β -amyloid burden does not correlate with cognitive or language deficits in Alzheimer's disease presenting as aphasia. *Eur J Neurol.* févr 2016;23(2):313-9.
68. Laforce R, Soucy J-P, Sellami L, Dallaire-Théroux C, Brunet F, Bergeron D, et al. Molecular imaging in dementia: Past, present, and future. *Alzheimers Dement.* nov 2018;14(11):1522-52.
69. Gómez-Isla T, Price JL, McKeel Jr. DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 15 juill 1996;16(14):4491-500.
70. Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, et al. Localization of Neurofibrillary Tangles and Beta-Amyloid Plaques in the Brains of Living Patients With Alzheimer Disease. *Am J Geriatr Psychiatry.* janv 2002;10(1):24-35.
71. Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, et al. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain.* 1 avr 2011;134(4):1089-100.
72. Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, et al. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain.* 1 avr 2011;134(4):1089-100.
73. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, et al. 18F-THK5351: A Novel PET Radiotracer for Imaging Neurofibrillary Pathology in Alzheimer Disease. *J Nucl Med.* 2 janv 2016;57(2):208-14.
74. Matsumura K, Ono M, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, et al. Synthesis and biological evaluation of novel styryl benzimidazole derivatives as probes for imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.* 1 juin 2013;21(11):3356-62.
75. Chien DT, Bahri S, Szardenings AK, Walsh JC, Mu F, Su M-Y, et al. Early Clinical PET Imaging Results with the Novel PHF-Tau Radioligand [F-18]-T807. *J Alzheimers Dis.* 1 janv 2013;34(2):457-68.
76. Chien DT, Szardenings AK, Bahri S, Walsh JC, Mu F, Xia C, et al. Early Clinical PET Imaging Results with the Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808. *J Alzheimers Dis.* 1 janv 2014;38(1):171-84.
77. Rojo LE, Alzate-Morales J, Saavedra IN, Davies P, Maccioni RB. Selective Interaction of Lansoprazole and Astemizole with Tau Polymers: Potential New Clinical Use in Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 7 janv 2010;19(2):573-89.
78. Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, Becker JA, Sepulcre J, Rentz D, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease: Tau PET in Aging and Early AD. *Ann Neurol.* janv 2016;79(1):110-9.
79. Hall B, Mak E, Cervenka S, Aigbirhio FI, Rowe JB, O'Brien JT. In vivo tau PET imaging in dementia: Pathophysiology, radiotracer quantification, and a systematic review of clinical findings. *Ageing Res Rev.* 1 juill 2017;36:50-63.

80. Walji AM, Hostetler ED, Selnick H, Zeng Z, Miller P, Bennacef I, et al. Discovery of 6-(Fluoro-¹⁸F)-3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-1-yl)isoquinolin-5-amine ([¹⁸F]-MK-6240): A Positron Emission Tomography (PET) Imaging Agent for Quantification of Neurofibrillary Tangles (NFTs). *J Med Chem*. 26 mai 2016;59(10):4778-89.
81. Lohith TG, Bennacef I, Vandenberghe R, Vandebulcke M, Salinas CA, Declercq R, et al. Brain Imaging of Alzheimer Dementia Patients and Elderly Controls with ¹⁸F-MK-6240, a PET Tracer Targeting Neurofibrillary Tangles. *J Nucl Med*. janv 2019;60(1):107-14.
82. Vivash L, O'Brien TJ. Imaging Microglial Activation with TSPO PET: Lighting Up Neurologic Diseases? *J Nucl Med*. 2 janv 2016;57(2):165-8.
83. Dupont A-C, Largeau B, Santiago Ribeiro MJ, Guilloteau D, Tronel C, Arlicot N. Translocator Protein-18 kDa (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) Imaging and Its Clinical Impact in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. avr 2017;18(4):785.
84. Fan Z, Calsolaro V, Atkinson RA, Femminella GD, Waldman A, Buckley C, et al. Flutriciclamide (18F-GE180) PET: First-in-Human PET Study of Novel Third-Generation In Vivo Marker of Human Translocator Protein. *J Nucl Med*. 11 janv 2016;57(11):1753-9.
85. Ikawa M, Lohith TG, Shrestha S, Telu S, Zoghbi SS, Castellano S, et al. 11C-ER176, a Radioligand for 18-kDa Translocator Protein, Has Adequate Sensitivity to Robustly Image All Three Affinity Genotypes in Human Brain. *J Nucl Med*. 2 janv 2017;58(2):320-5.
86. Rodriguez-Vieitez E, Ni R, Gulyás B, Tóth M, Häggkvist J, Halldin C, et al. Astrocytosis precedes amyloid plaque deposition in Alzheimer APP^{swe} transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. juin 2015;42(7):1119-32.
87. GUIDE_CAH__BOS_2011-3.pdf [Internet]. [cité 3 août 2019]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/GUIDE_CAH__BOS_2011-3.pdf

Annexe 1 : Les critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer, NINCDS-ADRDA

1. Critères de maladie d'Alzheimer probable :
 - syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination*, le *Blessed Dementia Scale* ou tout autre test équivalent et confirmé par des preuves neuropsychologiques
 - déficit d'au moins deux fonctions cognitives
 - altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives
 - absence de trouble de conscience
 - survenue entre 40 et 90 ans, le plus souvent au-delà de 65 ans
 - en l'absence de désordres systémiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant rendre compte par eux-mêmes, des déficits mnésiques et cognitifs progressifs
2. Ce diagnostic de maladie d'Alzheimer probable est renforcé par :
 - la détérioration progressive des fonctions telles que le langage (aphasie), les habilités motrices (apraxie) et perceptives (agnosie)
 - la perturbation des activités de la vie quotidienne et la présence de troubles du comportement
 - une histoire familiale de troubles similaires surtout si confirmés histologiquement
 - le résultat aux examens standards suivants :
 - normalité du liquide céphalo-rachidien
 - EEG normal ou siège de perturbations non spécifiques comme la présence d'ondes lentes
 - présence d'atrophie cérébrale d'aggravation progressive
3. Autres caractéristiques cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable après exclusion d'autres causes :
 - période de plateaux au cours de l'évolution
 - présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophe, désordres sexuels et perte de poids. Des anomalies neurologiques sont possibles surtout aux stades évolués de la maladie, notamment des signes moteurs tels qu'une hypertonie, des myoclonies ou des troubles de la marche.
 - crises comitiales aux stades tardifs
 - scanner cérébral normal pour l'âge
4. Signes rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain ou improbable :
 - début brutal
 - déficit neurologique focal tel que hémiparésie, hypoesthésie, déficit du champ visuel, incoordination motrice à un stade précoce
 - crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie
5. Le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer possible :
 - peut être porté sur la base du syndrome démentiel, en l'absence d'autre désordre neurologique, psychiatrique ou systémique susceptible de causer une démence, en présence de variante dans la survenue, la présentation ou le cours de la maladie ;
 - peut être porté en présence d'une seconde maladie systémique ou cérébrale susceptible de produire un syndrome démentiel mais qui n'est pas considérée comme la cause de cette démence ;
 - et pourrait être utilisé en recherche clinique quand un déficit cognitif sévère progressif est identifié en l'absence d'autre cause identifiable.
6. Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :
 - les critères cliniques de la maladie d'Alzheimer probable ;
 - et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie.

Annexe 3 : Tableau des consommables utilisés pour une synthèse de MRP

Grandes étapes	Etapas	consommables	quantité	coût en €	qté pour 1 tir	prix pour 1 tir en €	
Préparation automate de synthèse	conditionnement C18	eau	1L	0,54	10mL	0,0054	
		ethanol	1L	13,94	10mL	0,1394	
	nettoyage automate	eau	1L	0,54	60mL	0,0054	
		ethanol	1L	13,94	60mL	0,8364	
		acetone	1L	1,64	60mL	0,0984	
Production du fluor		eau enrichie	150g	5850	2,5 g	97,5	
synthèse		hélium	1 bouteille/mois	46		10	
		QMA			1	5	
		K222			600µL	10	
		Acetonitrile	50mL	27,5	3mL	1,65	
		air médical (refroidissement automate)	1,5 bouteille/mois	48		12	
		DMSO	1L	77	1,5mL	0,1155	
		précurseur			2,5mg		
		HCl	1L	79	900µL	0,079	
		NaOH	1kg	79	490mg	0,03871	
		citrate trisodique	500g	65	294mg	0,03822	
		flacon récupération eau lourde			1	20 €	
	purification		eau	1L	0,54	10mL	0,0054
			colonne C18			1	2
		ethanol	1L	13,74	2mL	0,003348	
		solvant(éthanol acetate de sodium)				0,5	
solution mère		filtre 0,22			1	0,44	
		flacon elumatic			1	20	
		dilution NaCl	20mL	0,045		0,045	
Contrôles qualité		papier pH				négligeable	
		solvant HPLC				0,5	
		produit froid de référence				gratuit	
		test colorimétrique Kryptofix			600µL	10	
		test de stérilité			1	22,95	
		endotoxines			1	81	
		PRN					
		Pureté chimique du lot de précurseur			1 176 €		

Serment de Galien

« Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque ».

Production of an experimental radiopharmaceutical drug targeting tau protein: feasibility and cost for institutional research

The tau protein stabilizes microtubule organization. During abnormal phosphorylation, interactions between microtubules and tau proteins decrease and tau will accumulate to form Paired Helical Filament (PHF): it is one of the characteristic lesions in Alzheimer's Disease (AD).

The presence of PHF can be detected by the injection of an experimental radiopharmaceutical drug (MRPE): [¹⁸F]-AV1451 coupled with PET imaging (positron emission tomography). This examination can be used in longitudinal studies to assess the kinetics of onset of these PHFs. At the University Hospital Center of Toulouse, we had requests for the production of this MRPE in the context of institutional clinical trial, and more recently for basic research. The objective of our study was to estimate the cost of a synthesis of [¹⁸F]-AV1451 in order to suggest a price for customers. First, we recalled the pathophysiology of AD and PHF training. We then looked at the production process of the [¹⁸F]-AV1451 in order to be able to evaluate the cost of the various items of expenditure. The operation of our fluoridation platform has been divided into 3 major expenditure categories.

After analyzing the various parameters, the theoretical cost of a synthesis of [¹⁸F]-AV1451 was estimated at € 2,279.30 for the basic research study. A higher price will be applied for use in clinical trials because of the quality controls necessary for an injection to humans. In our type of institutional research structure, the quest for a balanced budget must be ensured in order to sustain the benefits, but this balance is difficult to achieve. The ambition of the institution is to promote research, the price offered to the researchers of the University Hospital is much lower than that calculated in this study. The benefits for the establishment are expressed here mainly in terms of publications rather than financial gain. However, knowing the right cost of production allows us to optimize our organization (clinical trial) and a possibility of correct pricing for external services. This study highlights the importance of the financial support of the University Hospital Center for the viability of such a platform and to have a transversal vision of the operation of the platform in order to guide a reflection in future choices.

Keywords : experimental radiopharmaceutical drug, Alzheimer's Disease, tau protein, institutional research, [¹⁸F]-AV1451

AUTEUR : Inès CASTANIE

TITRE : Production d'un médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE) ciblant la protéine tau : faisabilité et coût pour la recherche institutionnelle

DIRECTEUR DE THESE : Mme SALABERT Anne-Sophie

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Le 27 Septembre 2019 à Toulouse

RESUME EN FRANÇAIS :

La protéine tau permet de stabiliser l'organisation microtubulaire. Lors d'une phosphorylation anormale, l'interaction avec les microtubules diminue et les protéines tau vont s'accumuler dans le cerveau en formant des Paires de Filament en Hélice (PHF) : c'est une des lésions retrouvées dans la Maladie d'Alzheimer (MA). La présence de PHF peut être détectée par l'injection d'un médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE) : l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 couplé à une imagerie TEP (tomographie par émission de positons). Cet examen peut être utilisé dans des études longitudinales permettant d'apprécier la cinétique d'apparition de ces PHF. Au CHU de Toulouse, nous avons eu des demandes de production de ce MRPE dans le cadre d'essai clinique institutionnel, et plus récemment pour de la recherche fondamentale. L'objectif de notre étude a été d'estimer le coût d'une synthèse d' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 afin d'établir un tarif à proposer à nos clients. Dans un premier temps, nous avons rappelé la physiopathologie de la MA et de la formation des PHF. Nous nous sommes ensuite intéressés au processus de production de l' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 afin de pouvoir évaluer le coût des différents postes de dépenses. Le fonctionnement de notre plateforme de fluoration a été réparti en 3 grands titres de dépenses. Après analyse des différents paramètres, le coût théorique d'une synthèse d' $[^{18}\text{F}]$ -AV1451 a été estimé à 2 279,30€ pour l'étude de recherche fondamentale. Un prix supérieur sera appliqué pour une utilisation dans les essais cliniques en raison des contrôles qualité nécessaires pour une injection à l'homme. Dans notre type de structure de recherche institutionnelle, la recherche de l'équilibre budgétaire est à assurer, pour pérenniser les prestations, mais cet équilibre est difficilement atteignable. L'ambition de l'institution étant de promouvoir la recherche, le prix proposé aux investigateurs du CHU est bien plus faible que celui calculé lors de cette étude. Les bénéfices pour l'établissement s'expriment ici principalement en termes de publications plus qu'en gain financier. Cependant la connaissance du juste coût de production nous permet une optimisation de notre organisation (essai clinique) et une possibilité de tarification correcte pour des prestations externes. Cette étude permet de mettre en avant l'importance du soutien financier du CHU pour la viabilité d'une telle plateforme et d'avoir une vision transversale du fonctionnement de la plateforme afin de pouvoir guider une réflexion lors des choix futurs.

MOTS-CLES Médicament Radiopharmaceutique Expérimental, Maladie d'Alzheimer, protéine tau, Recherche institutionnelle, $[^{18}\text{F}]$ AV1451

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Hospitalière

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier - Toulouse III - Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des Maraîchers 31062 TOULOUSE CEDEX