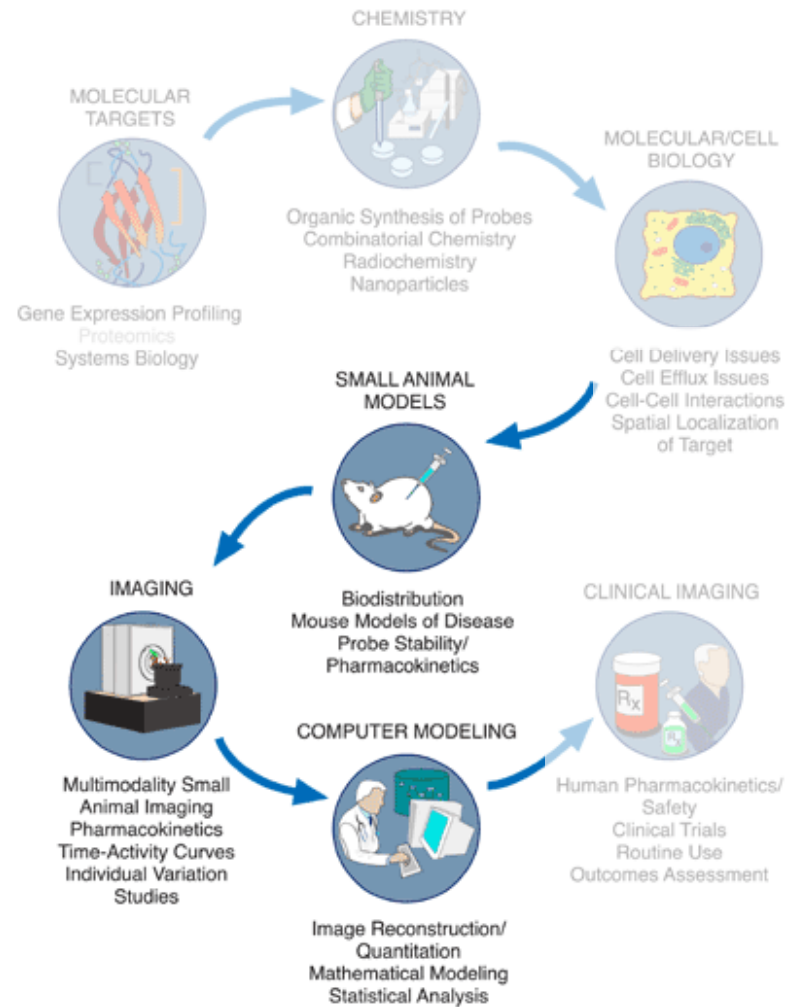


Imagerie des gènes rapporteurs



L'imagerie regroupe les moyens d'acquisition et de restitution d'images d'organismes vivants

Imagerie:



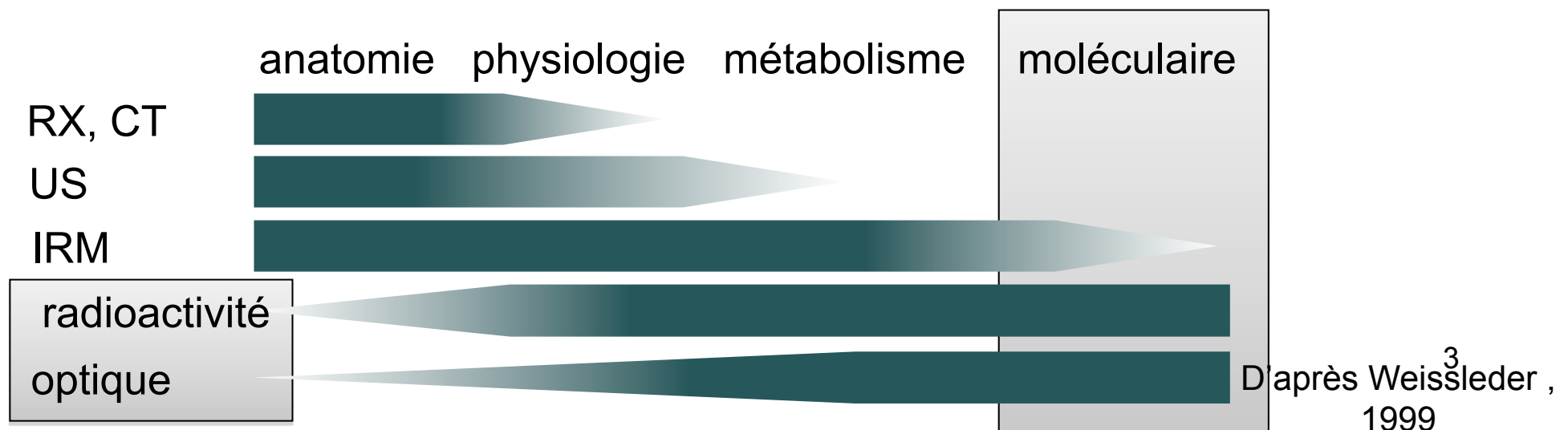
Objectif: visualiser le fonctionnement des cellules et des processus moléculaires des organismes vivants, sans les perturber.

Différentes modalités:

- Rayons X TDM/CT
- Magnétisme IRM/RMI
- Radioactivité TEP/PET et TEMP/SPECT
- Acoustique échographie
- Optique BLI, FRI, FMT

... couplées au développement d'outils moléculaires:

- traceurs
- sondes (Ac, ligands, aptamères, récepteurs, substrats...)
- gènes rapporteurs



Imagerie des gènes rapporteurs

I- Transgenèse

II- Imagerie de la transgenèse

II- 1 Fluorescence

II- 2 Bioluminescence

II- 3 Comparaison des techniques de luminescence

II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photons γ unique

II- 5 Détection associant plusieurs méthodes

III Autre application: imagerie des thérapies cellulaires

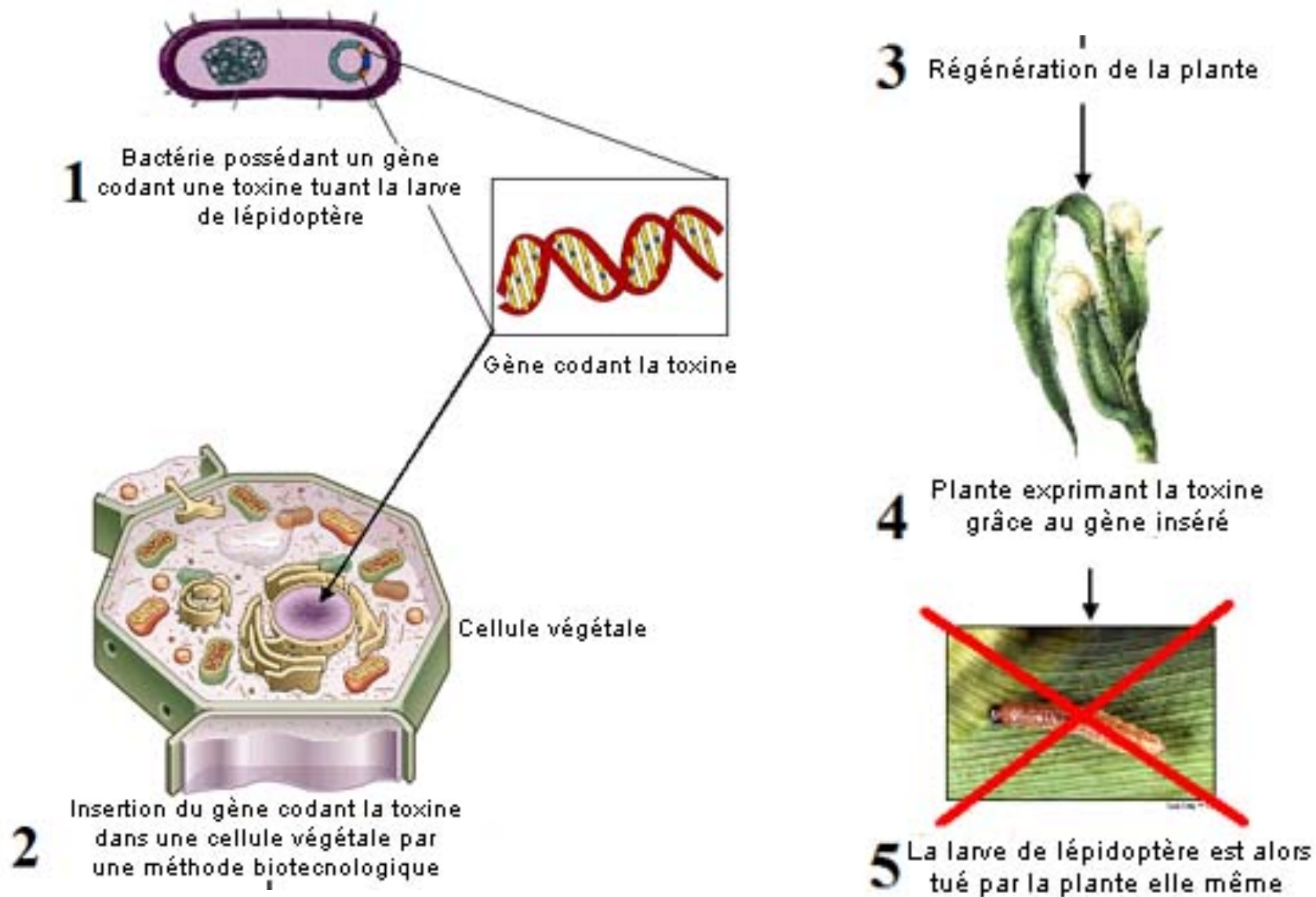
I- Transgénèse

Addition d'un gène étranger, appelé transgène,

L'organisme ou la cellule vivante qui reçoit l'ADN étranger réagit en fonction de l'information génétique qui lui est transmise, par exemple en **fabriquant une protéine non synthétisée naturellement.**

Comme toute manipulation génétique, la transgénèse nécessite la mise en œuvre d'une succession d'outils et de techniques de biologie moléculaire complexes.

I- Transgénèse



I- Transgénèse: étapes

- Repérer un caractère intéressant dans un organisme vivant et **identifier** la protéine responsable de ce caractère

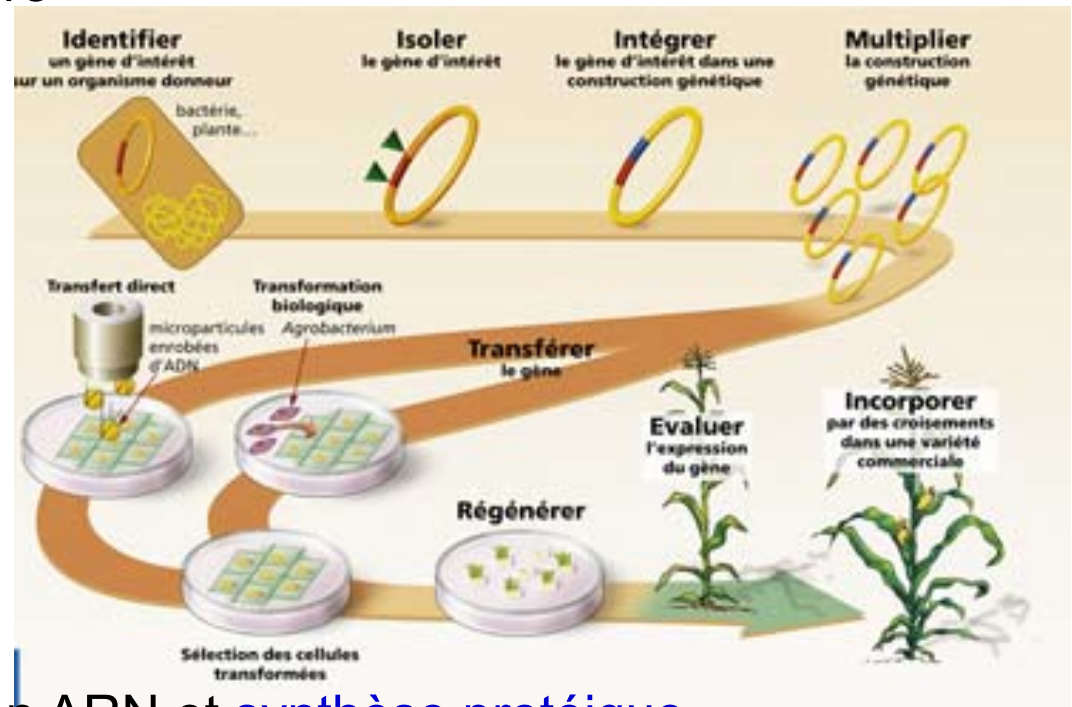
- **Isoler** le gène d'intérêt

- **Insérer** le fragment d'ADN (**transgène**) dans un **plasmide**

- **Transduction ou Transfection** : introduire le plasmide modifié dans le génome de la cellule hôte

- **Transcription** de l'ADN étranger en ARN et **synthèse protéique**

- **Evaluer l'efficacité et l'expression** du transfert chez l'hôte

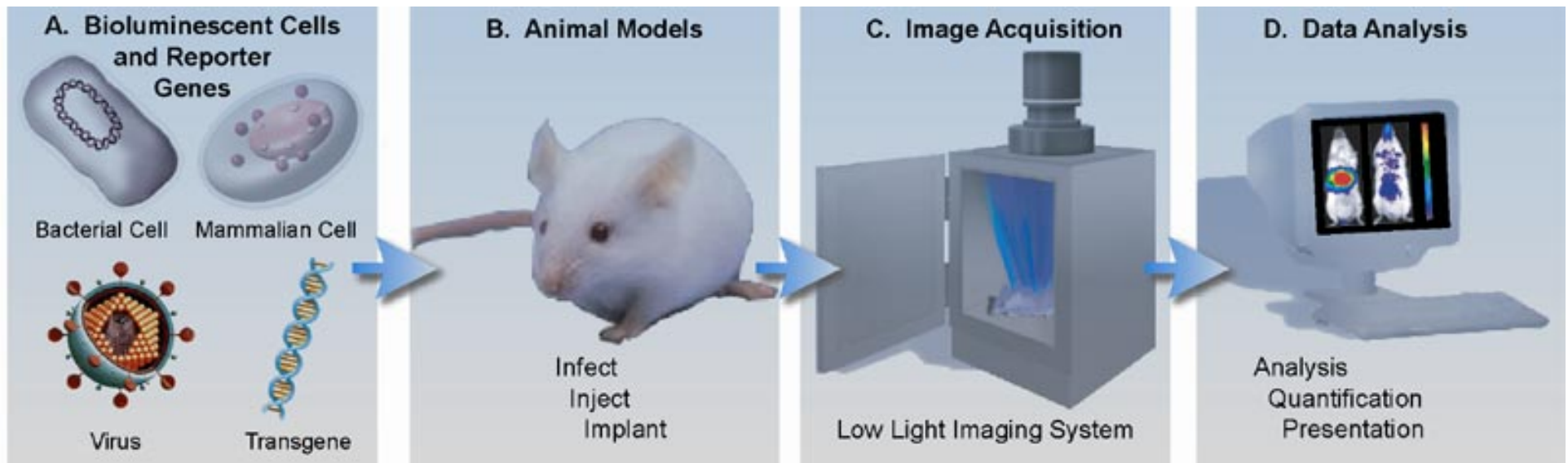


I- Transgénèse: contrôle

- Evaluer l'efficacité et l'expression du transfert chez l'hôte

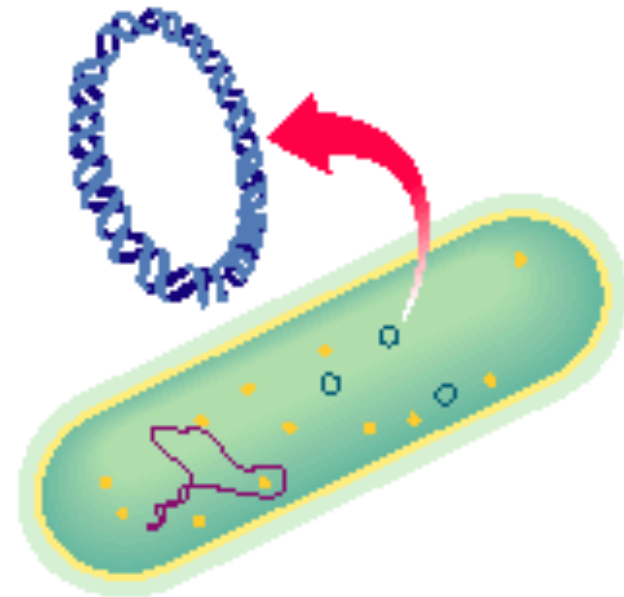


Contrôle par imagerie : gène rapporteur

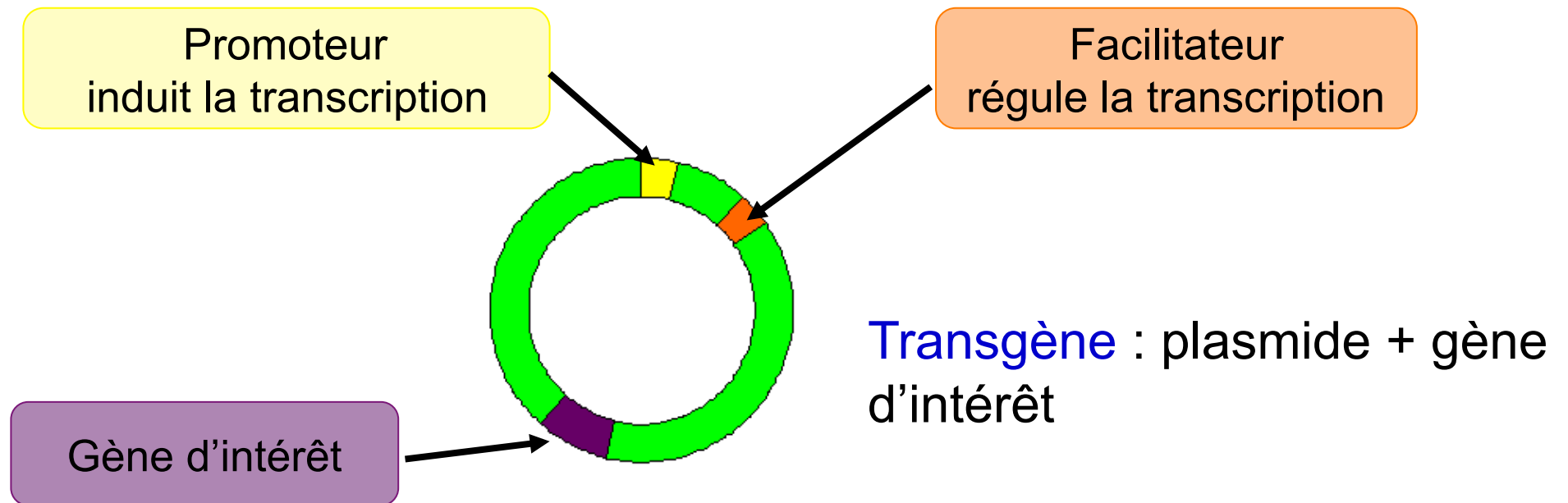


I- Transgénèse

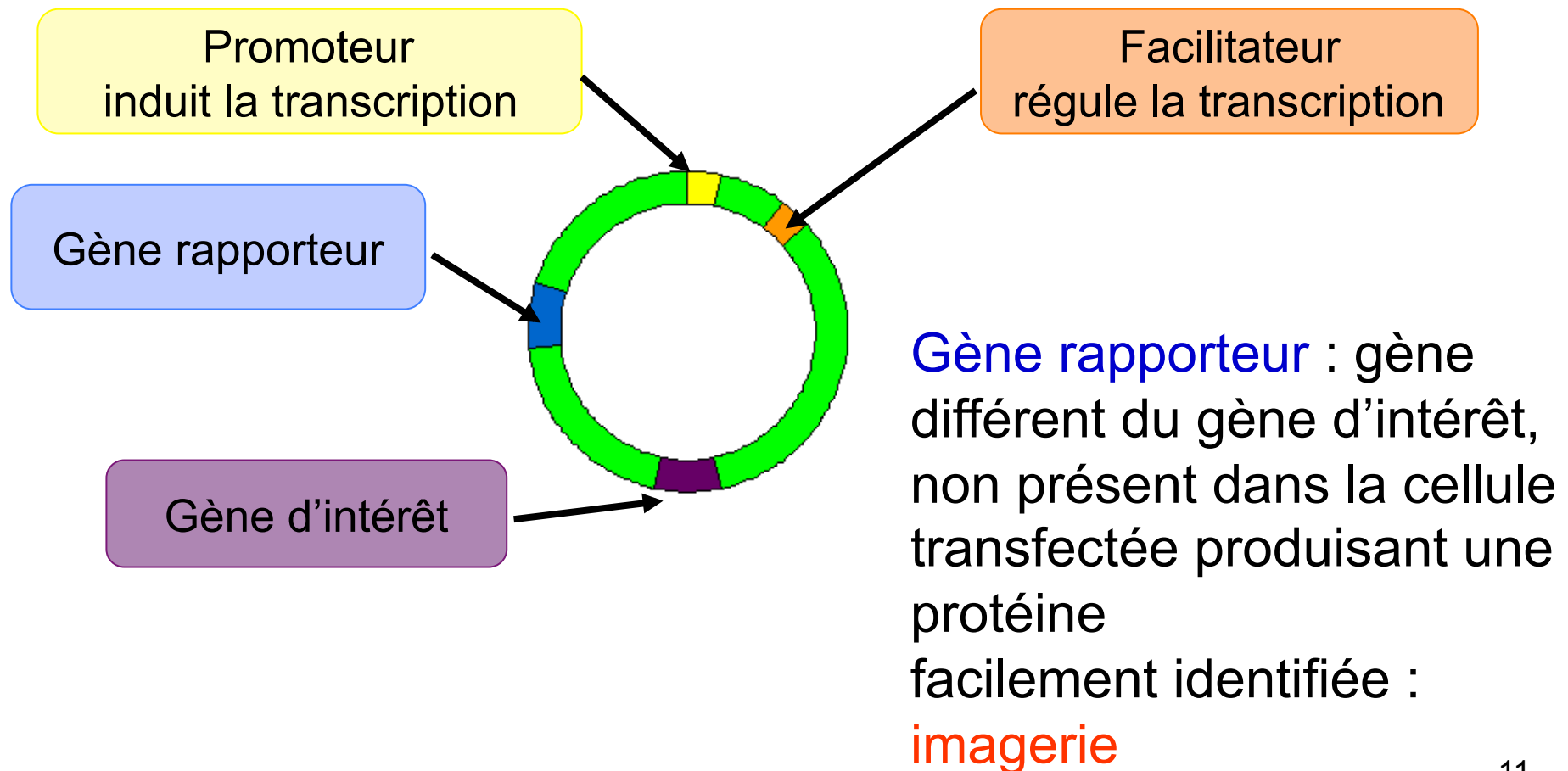
- **Plasmides** : petites molécules d'ADN circulaires distinctes du chromosome bactérien
- Réplication indépendante



I- Transgénèse

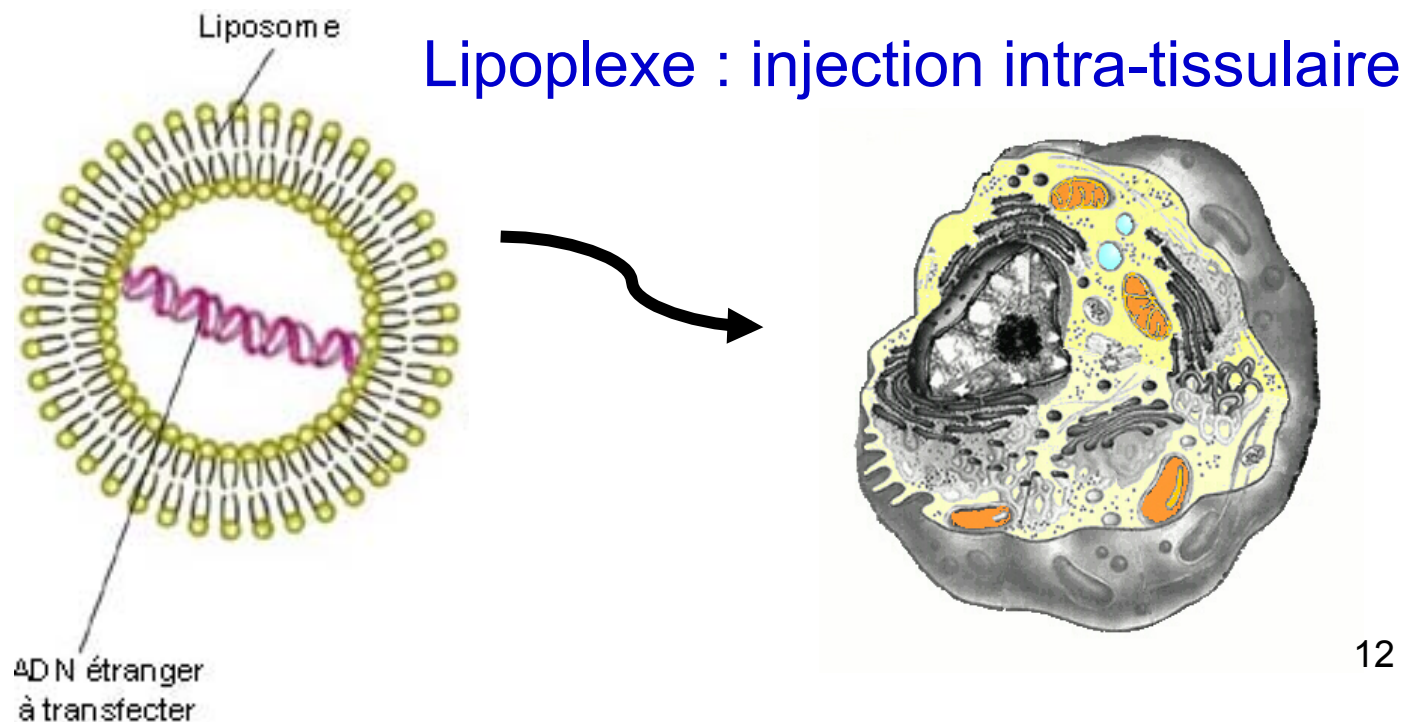


I- Transgénèse



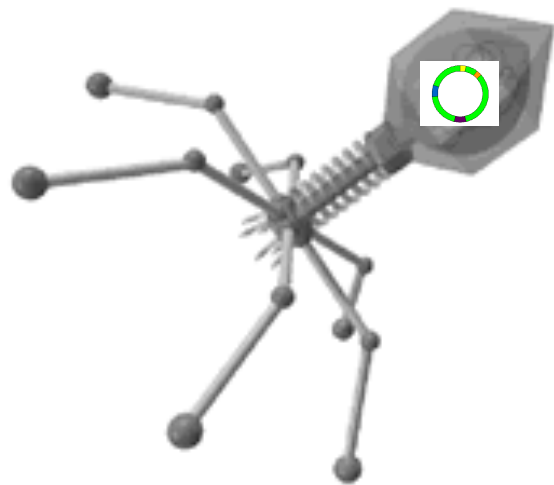
I- Transgénèse: différents modes de transduction

- injection intra-tissulaire directe : peu efficace
- liposomes : double couche phospholipidique capable de s'absorber sur la membrane cellulaire

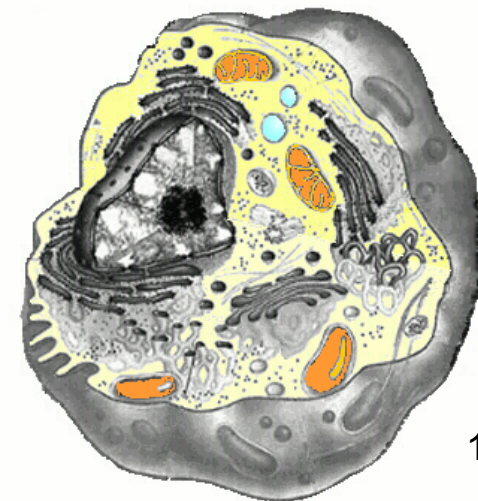


I- Transgénèse: différents modes de transduction

- vecteurs biologiques bactériens et surtout viraux
 - rétrovirus
 - adénovirus
 - herpes virus
- blocage de la réplication virale et infection de la cellule par le virus : **expression des gènes du virus sf réplication, du gène thérapeutique et du gène rapporteur**
- **Incorporation du transgène dans le génome cellulaire**

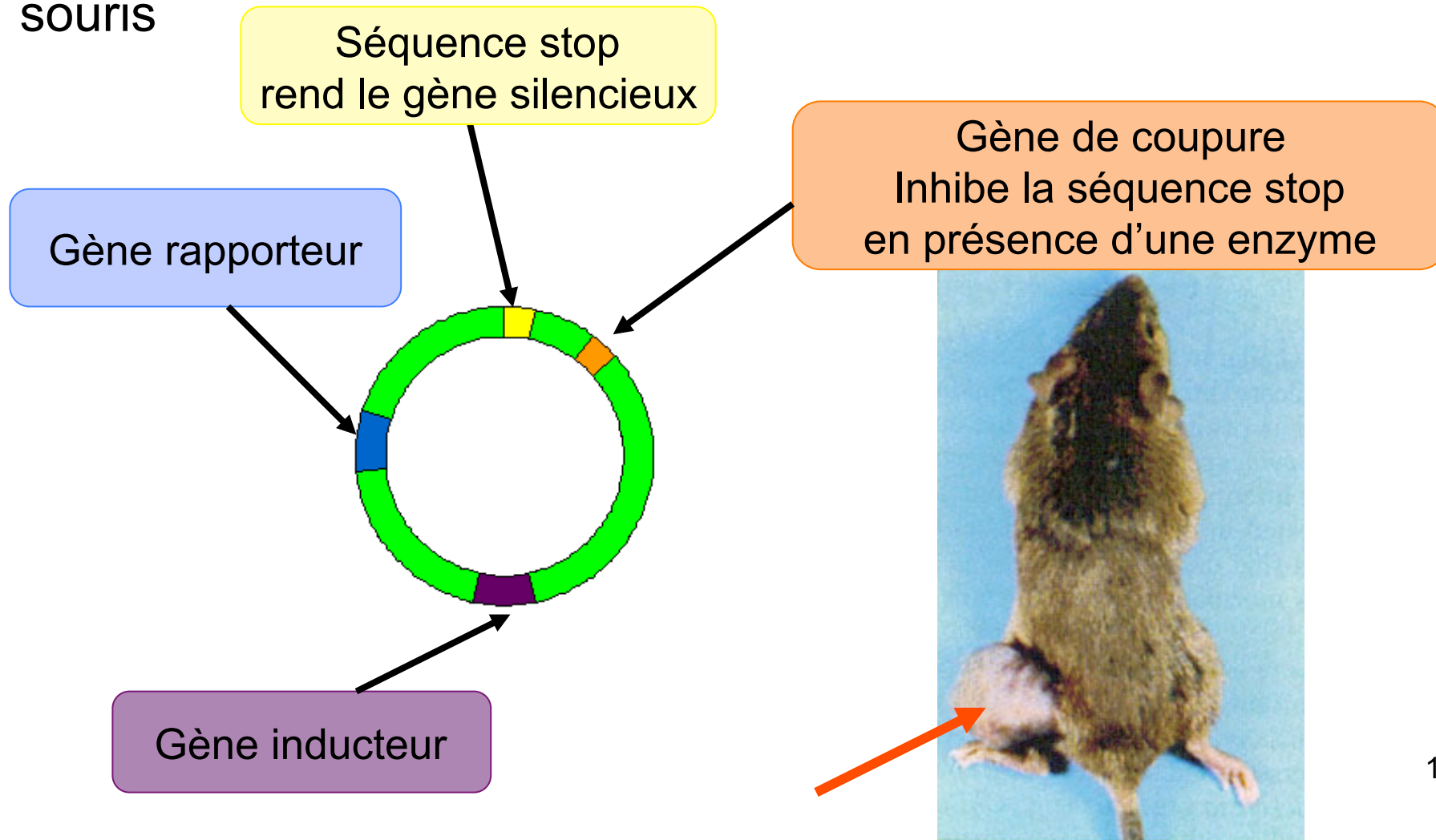


injection intra-tissulaire ou IV



I- Transgénèse: différents modes de transduction

- Cas particulier : greffe d'un gène inducteur de cancer chez la souris



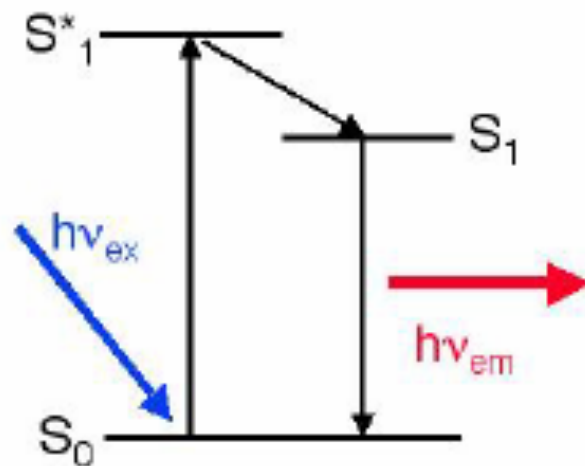
II- Imagerie de la transgénèse

Principe : - visualisation *in-vivo* des effets du gène rapporteur
- témoin de l'incorporation et de l'expression du gène d'intérêt (thérapeutique)

Méthodes :

- **Fluorescence:** absorption puis ré-émission de lumière à une λ différente → détection d'une protéine fluorescente
- **Bioluminescence :** production et émission de lumière par un organisme vivant → détection d'une protéine émettrice de lumière visible (luciférase)
- **SPECT ou TEP :** - prodrogue radiomarquée
- ligand radiomarqué d'un récepteur cellulaire¹⁵

Fluorescence



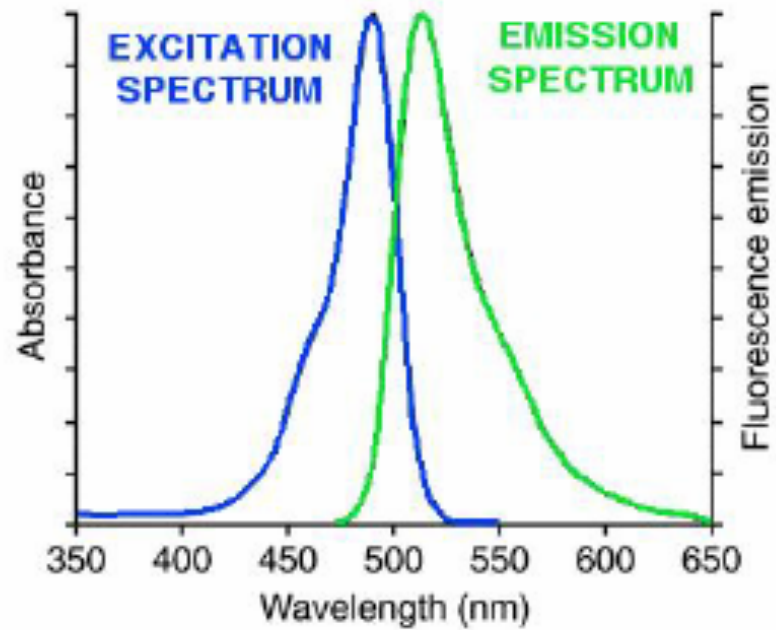
Photons from an external source are absorbed by a fluorophore creating an excited electronic state

The excited state exists for a finite time ($\sim 10^{-9}$ s) during which some energy is dissipated, resulting a relaxed excited state (competition with other decay modes also occurs during this time)

A lower energy photon is emitted returning the fluorophore to the ground state

$$\text{STOKES SHIFT} = h\nu_{ex} - h\nu_{em}$$

Emission/Absorption

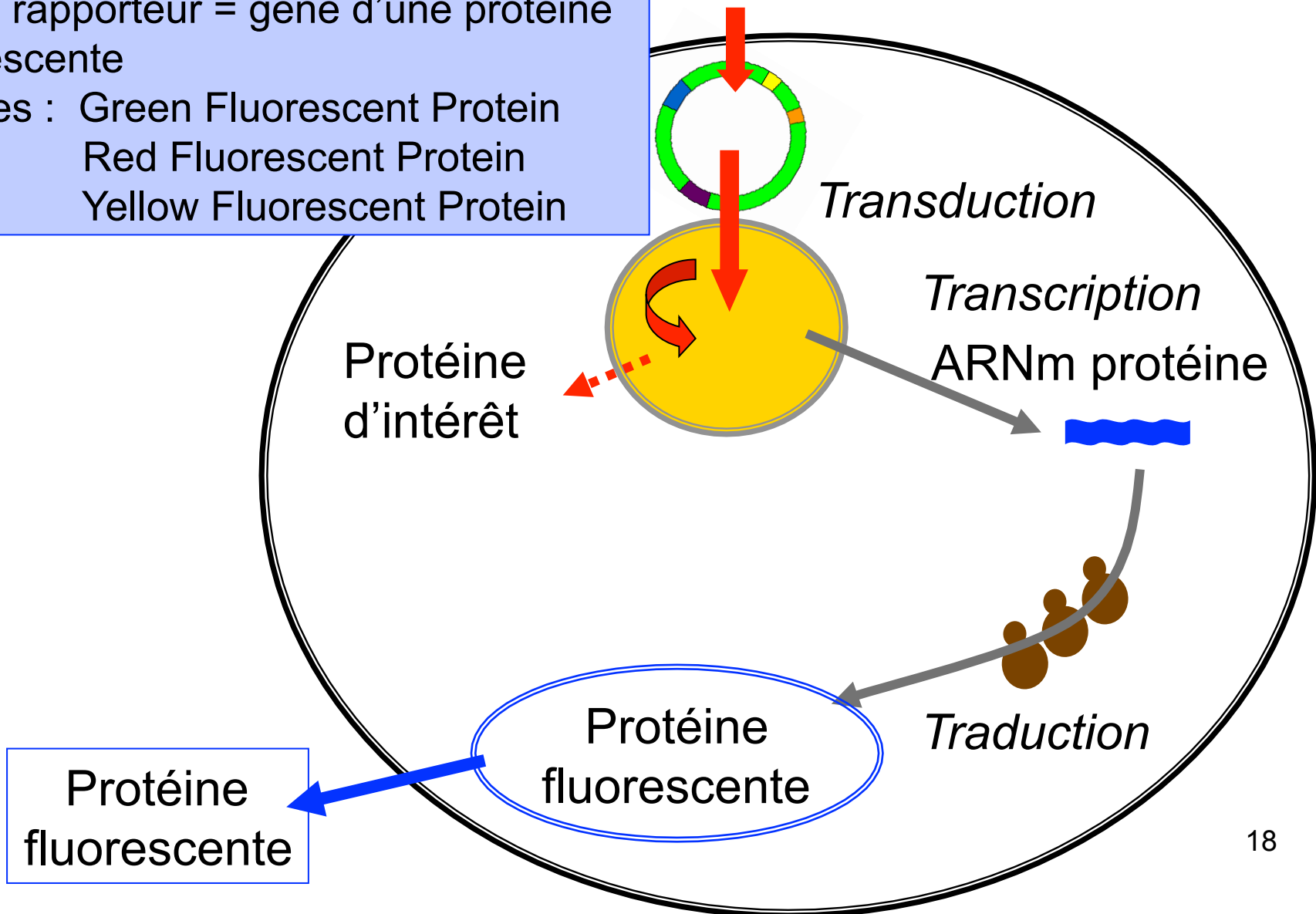


FITC (Fluorescein)

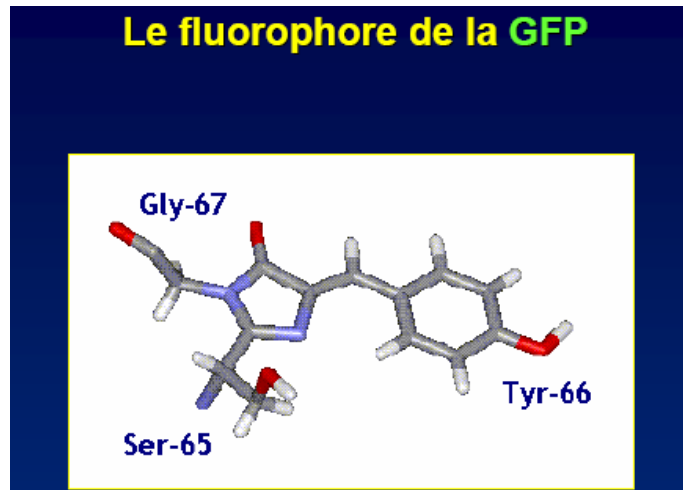
II- 1 Fluorescence

Gène rapporteur = gène d'une protéine fluorescente

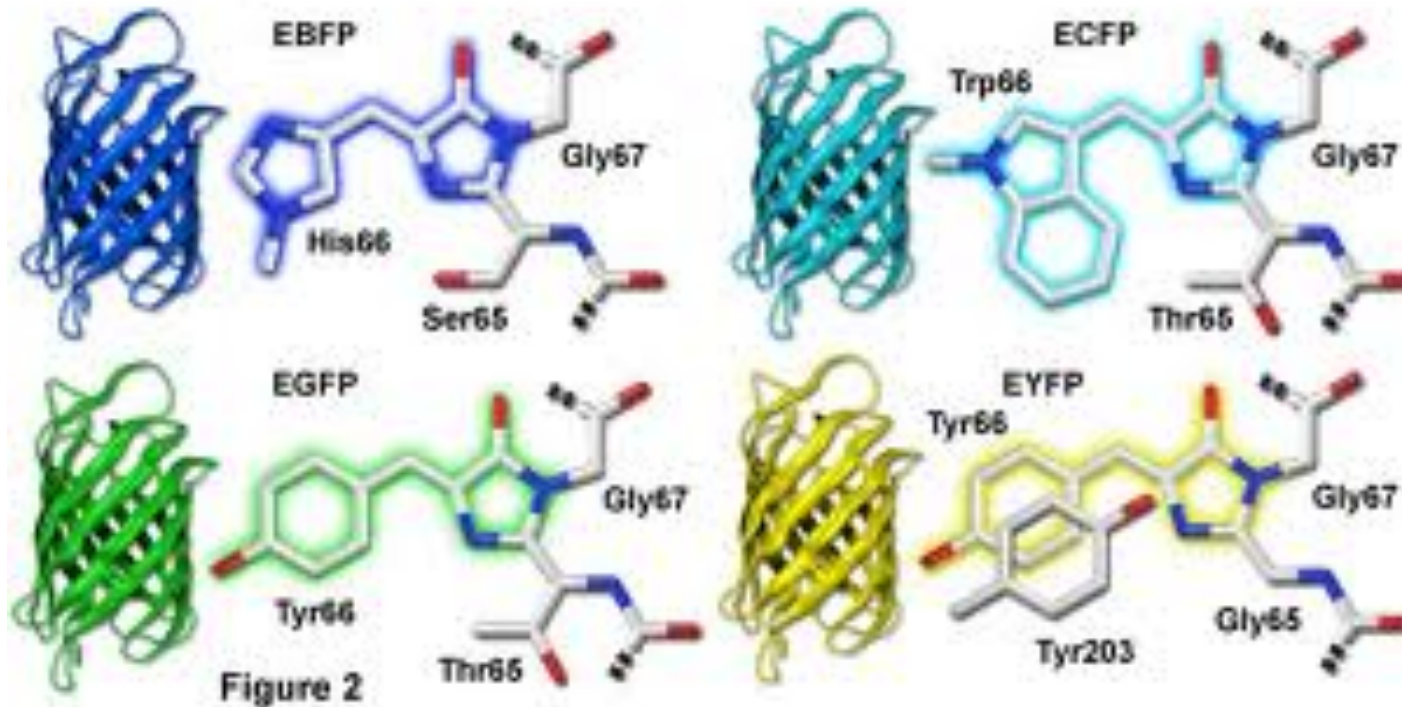
3 types : Green Fluorescent Protein
Red Fluorescent Protein
Yellow Fluorescent Protein



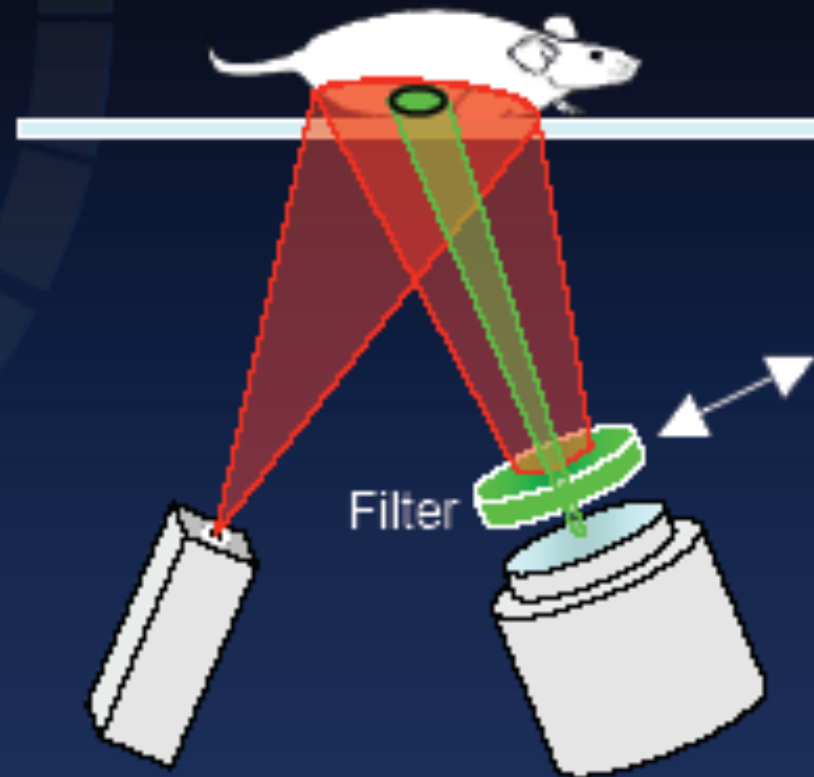
II- 1 Fluorescence



Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants



Detecting Fluorescence



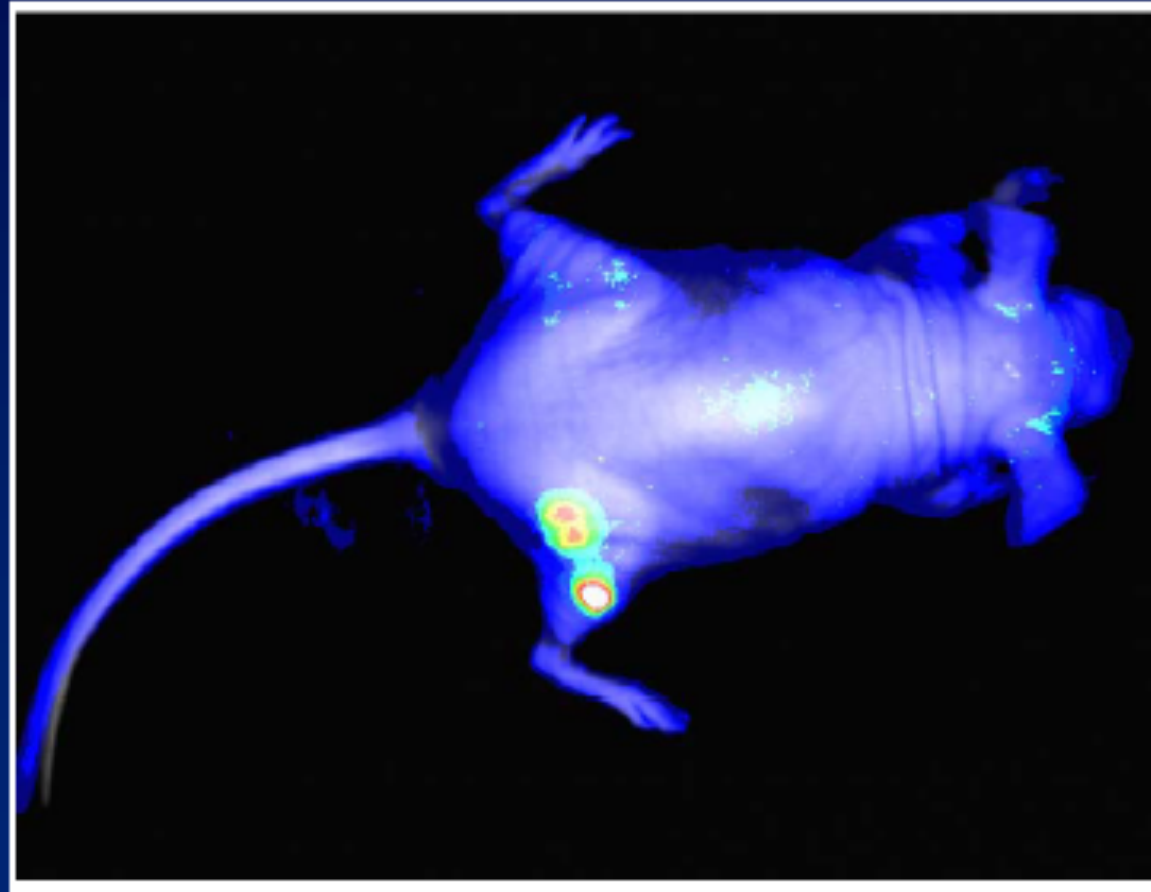
Light source
(Broadband + filter/Laser)

Detection apparatus
(CCD camera)

II- 1 Fluorescence



II- 1 Fluorescence



Expression de l'EGFP dans différentes cellules tumorales

II- 2 Bioluminescence

gène rapporteur : gène de la **luciférase**

Luciole



Poisson-lanterne

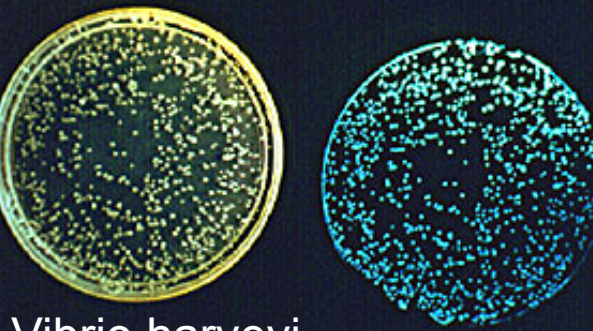


Euphausia sp.



9b
©1997 Steven Haddock (haddock@lifesci.ucsb.edu)

Renilla sp.



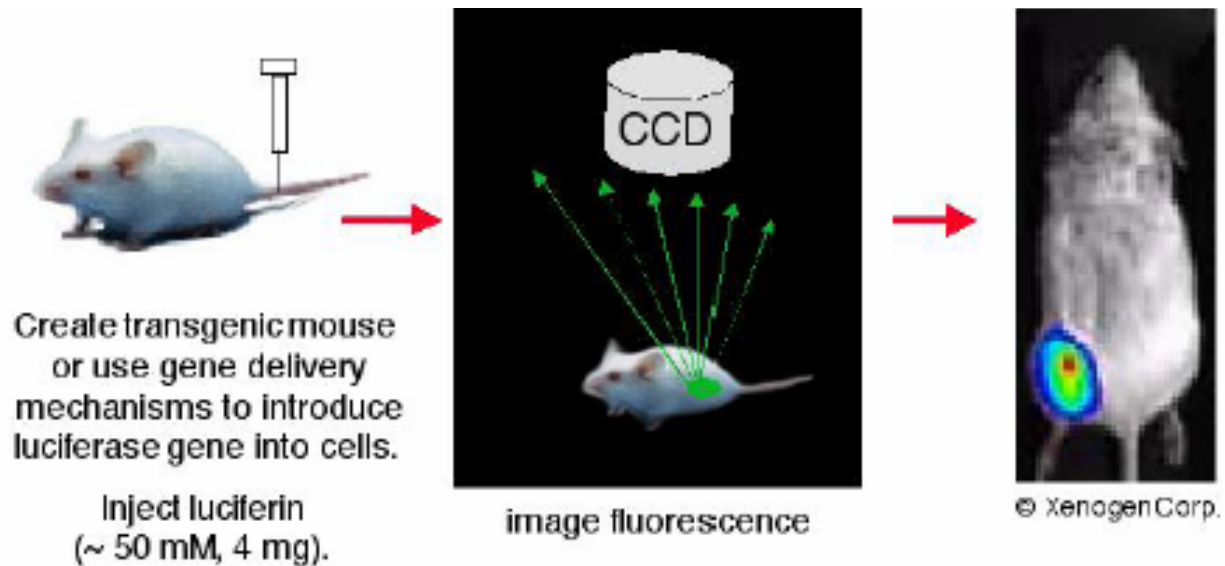
Vibrio harveyi

Champignon

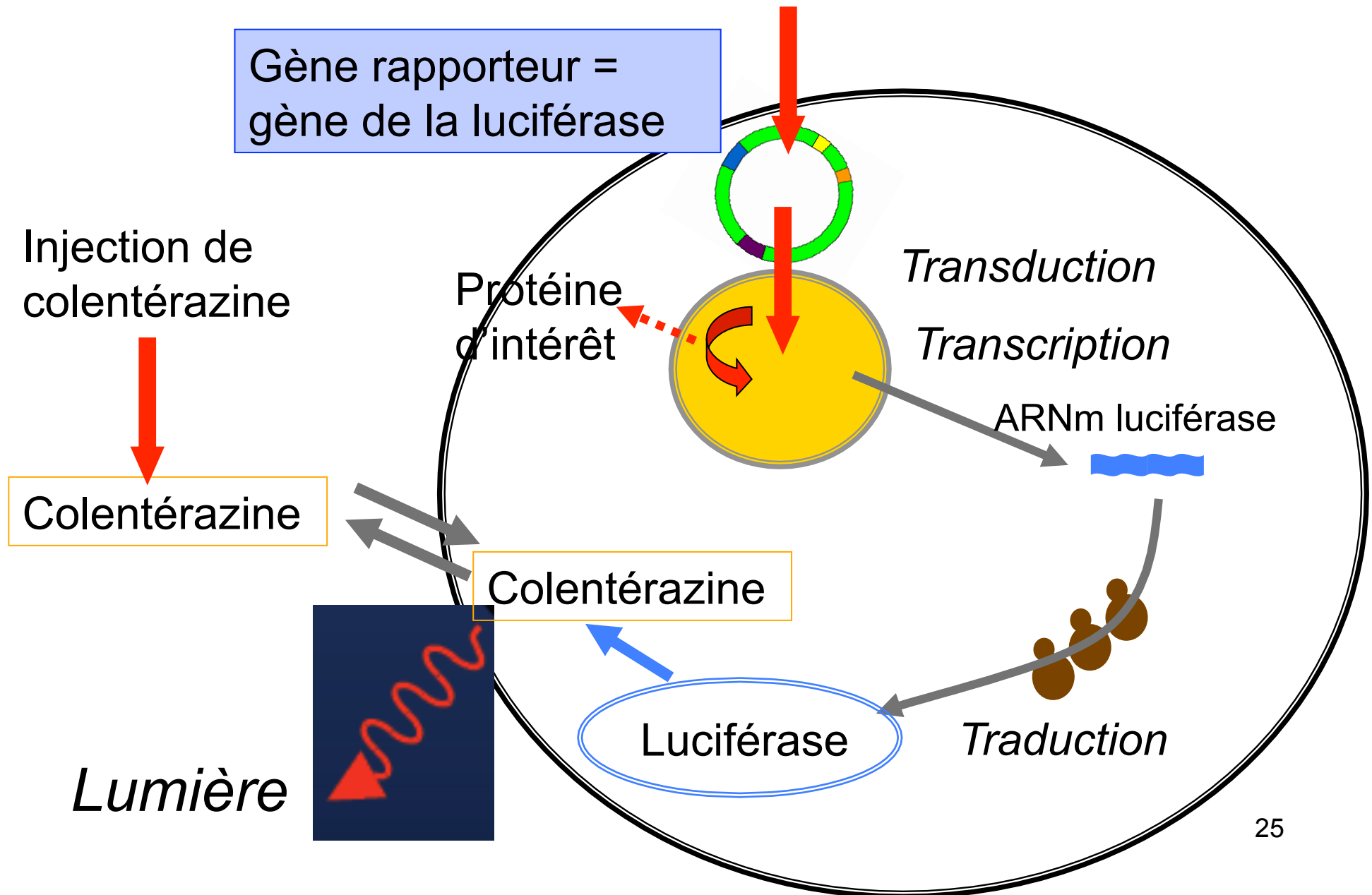


II- 2 Bioluminescence

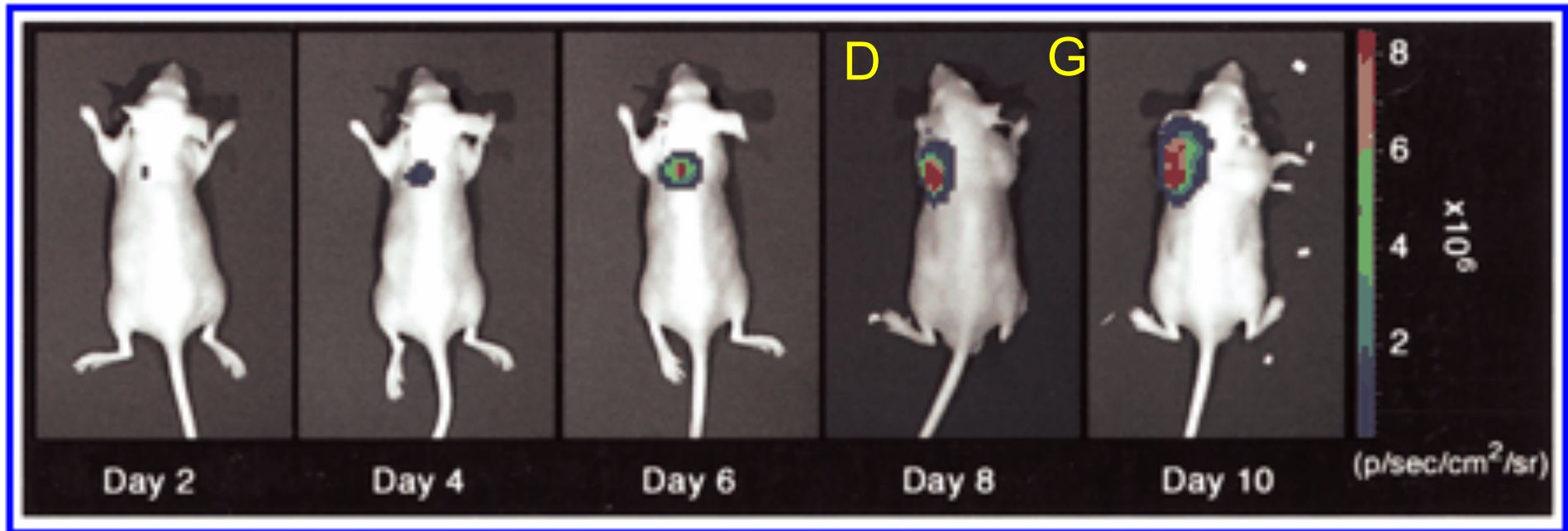
organisme	substrat	dépendance	λ_{max} (nm) à 37°C, in vitro	produits
bactérie	FMNH ₂	O ₂	495	Carboxylate + FMN + photons
luciole	luciférine	ATP et O ₂	612	Oxyluciférine + AMP+ PPI + CO ₂ + photons
méduse	coelentérazine	O ₂	480	Coelentéramide + CO ₂ + photons



II- 2 Bioluminescence



II- 2 Bioluminescence



Injection de cellules tumorales dans les 2 épaules:

- Epaule G : gène tumoral seul
- Epaule D : gène tumoral et gène de la luciférase

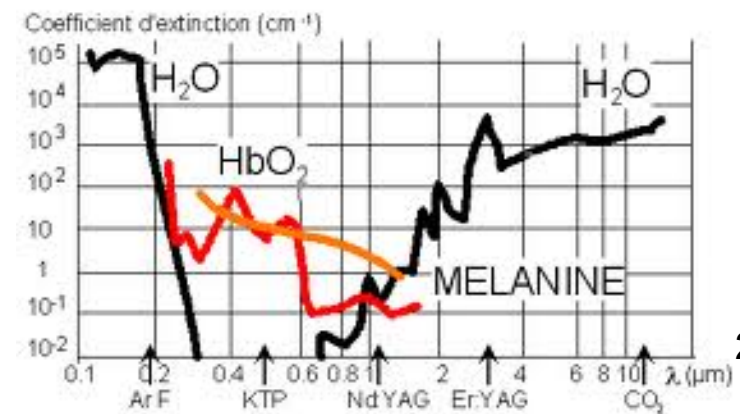
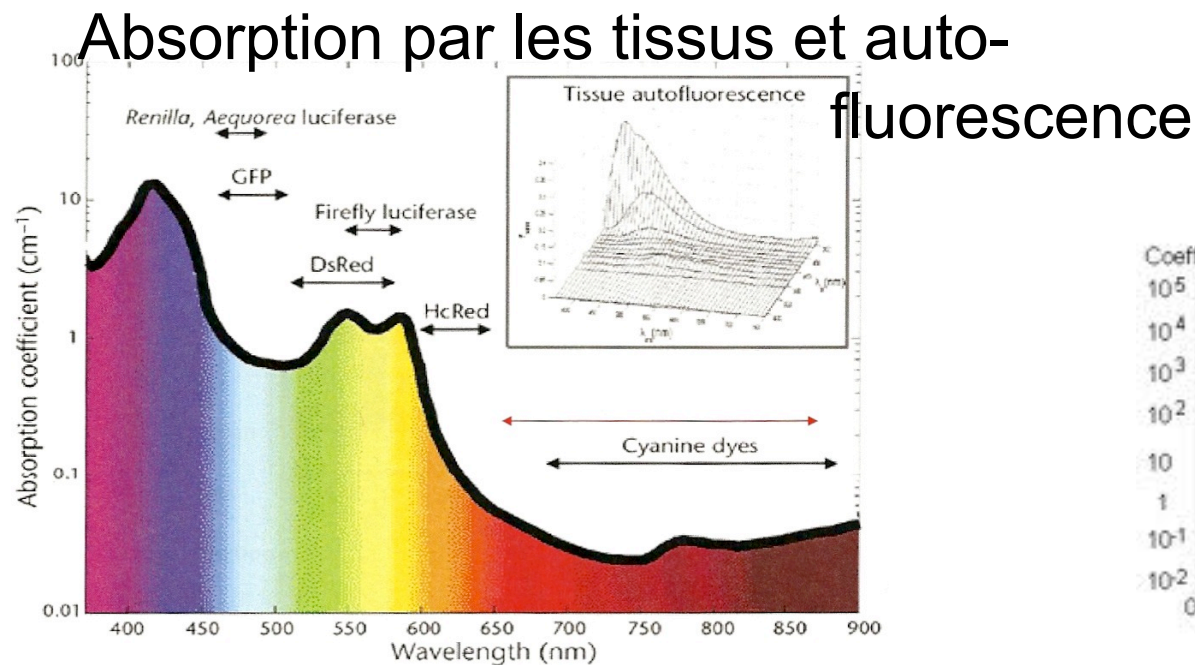
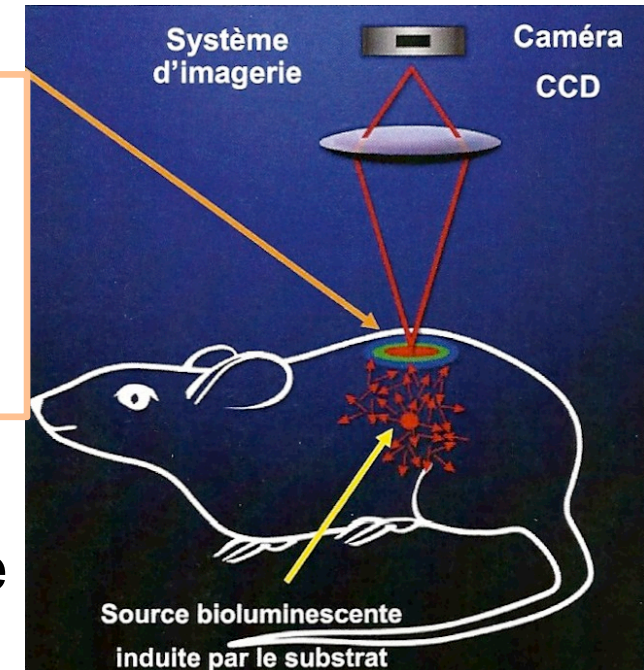
Evolution de la bioluminescence après injection de
luciférine-colentérazine

II- 3 Comparaison des techniques de luminescence

Les photons diffusent à travers des milieux turbides d'absorbance variée

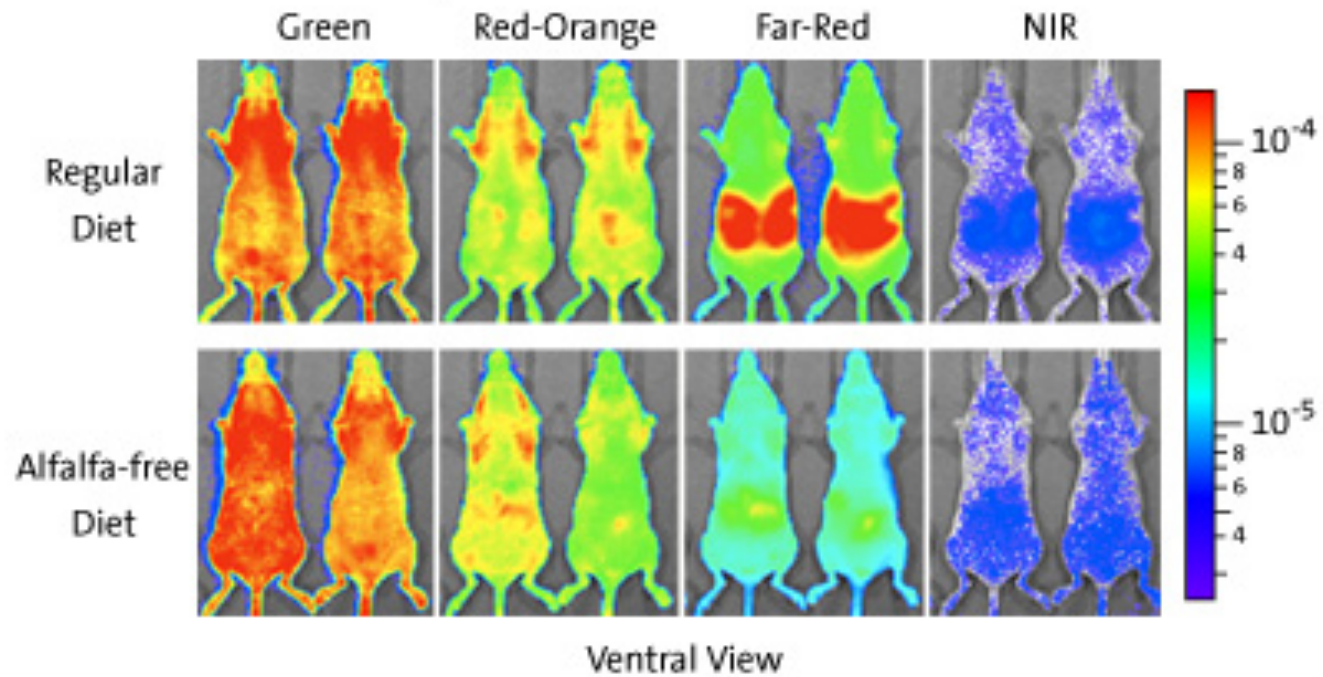
L'intensité de la surface dépend de:

- la profondeur de la source
- l'intensité et la forme de la source
- la longueur d'onde d'émission
- les propriétés optiques des tissus traversés



II- 3 Comparaison des techniques de luminescence

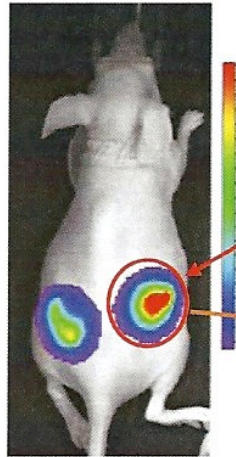
Autofluorescence Images of Control Mice



II- 3 Comparaison des techniques de luminescence

Bioluminescence vs fluorescence *in vivo*

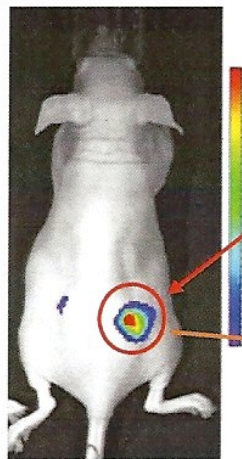
Bioluminescence



10⁷ cellules PC3-luc/DsRed

Sig/bkg = 2 200

Sig/bkg = 5



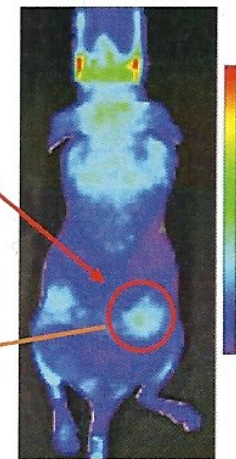
10⁶ cellules PC3-luc/DsRed

Sig/bkg = 250

Sig/bkg ~ 1

Min détection ~ 5 00 cellules

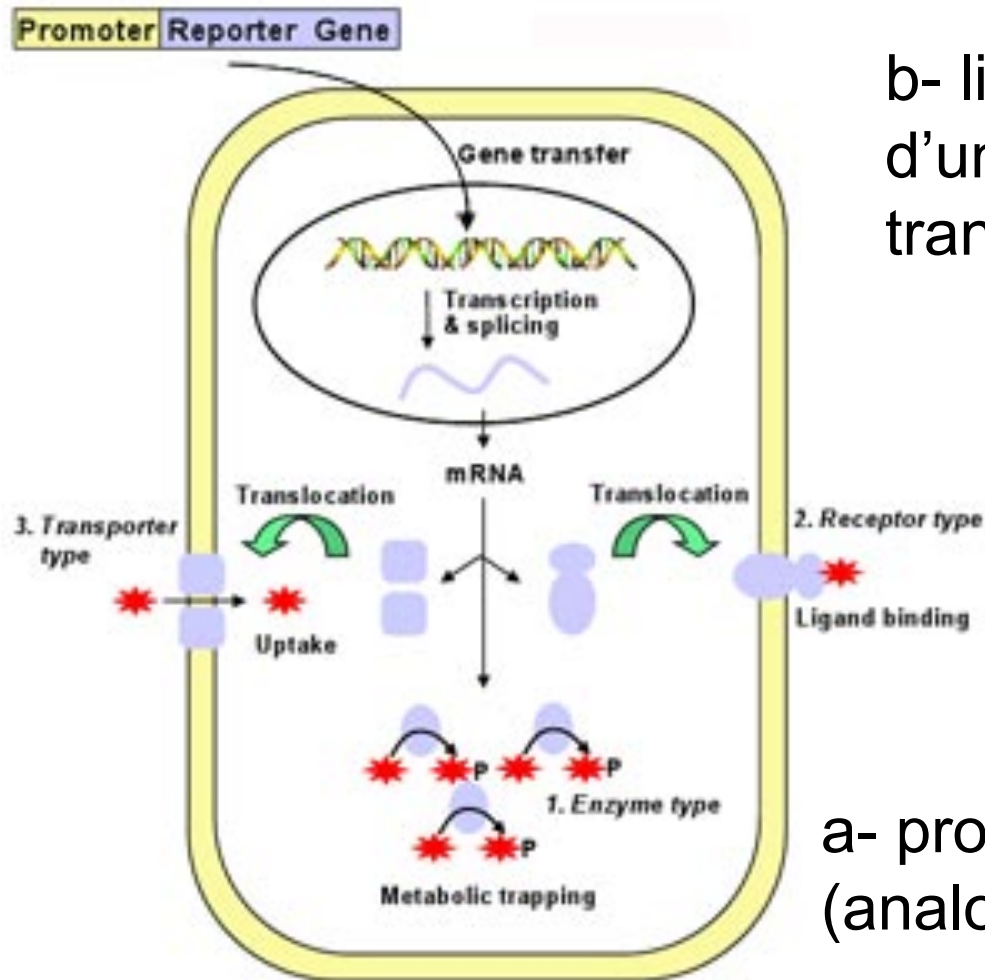
Fluorescence



Min détection ~ 10⁵ cellules₂₉

Muriel Busson, IRCM, Montpellier

II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

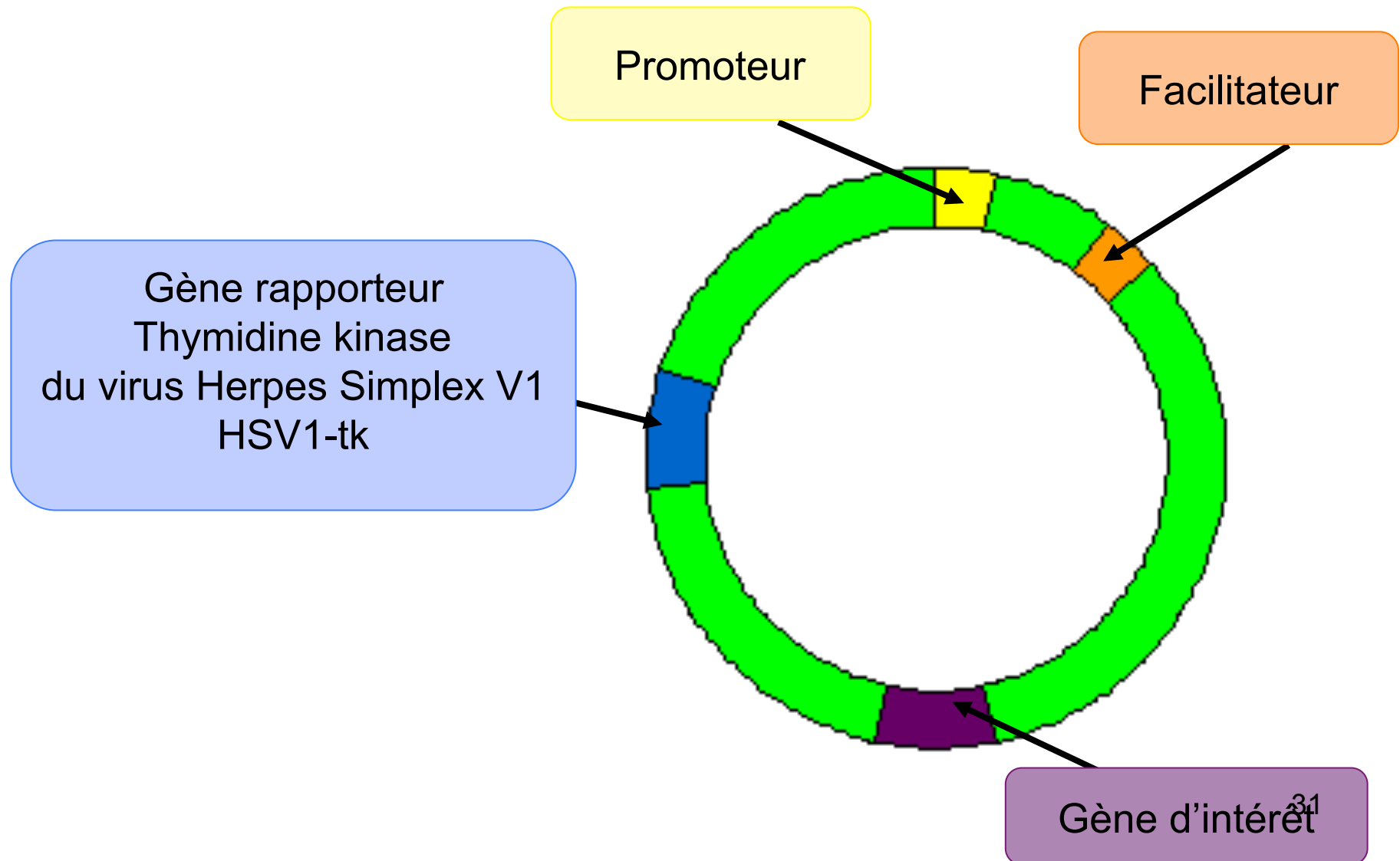


b- ligand radiomarqué
d'un récepteur ou d'un
transporteur cellulaire

a- prodrogue radiomarquée
(analogues de nucléosides)

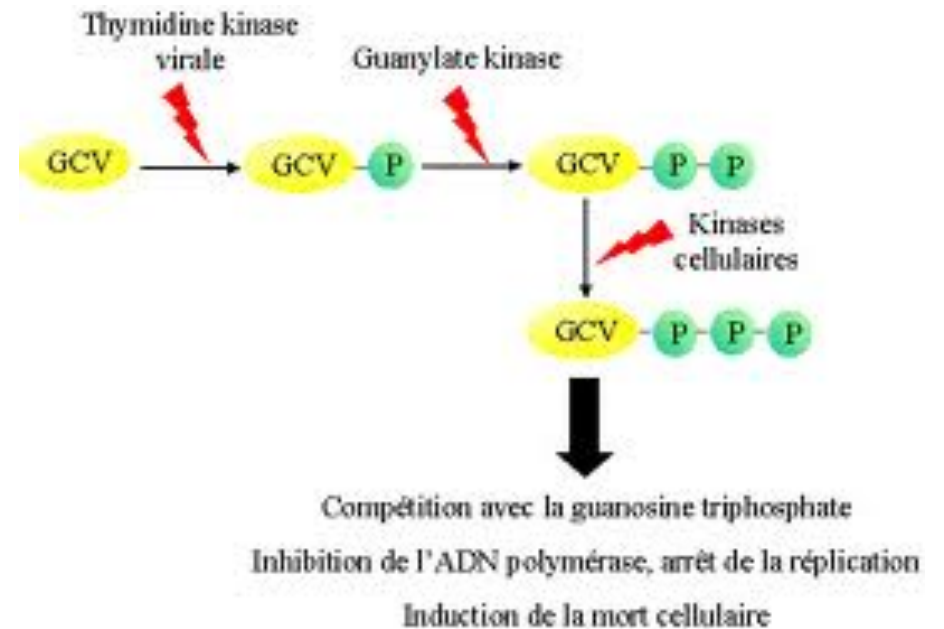
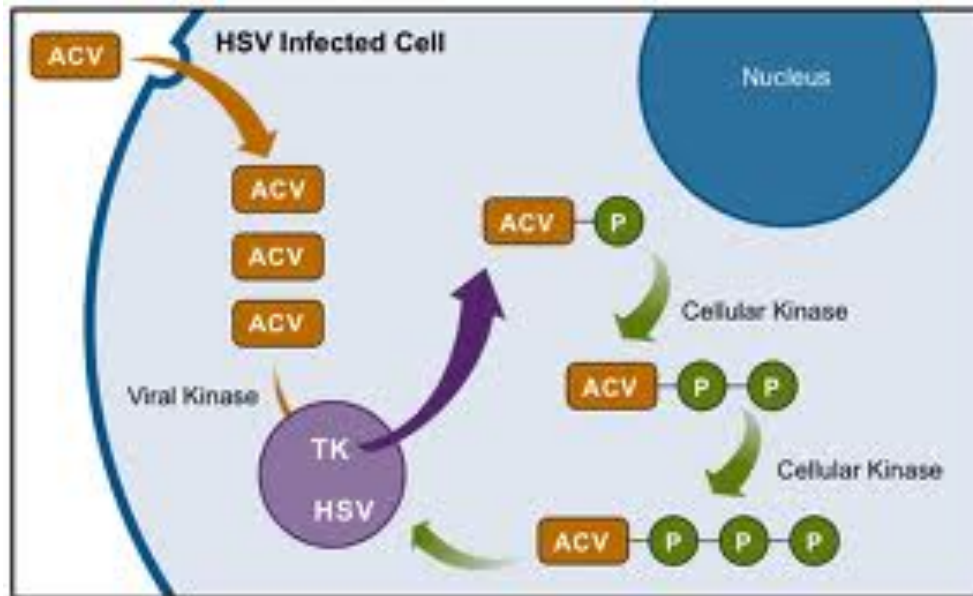
II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

a- prodrogue radiomarquée (analogues de nucléosides)



II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

Thymidine kinase du virus Herpes Simplex V1 HSV1-tk



II- 4 Tomographie Emission de Positons

-Expression de la thymidine kinase HSV1-tk:

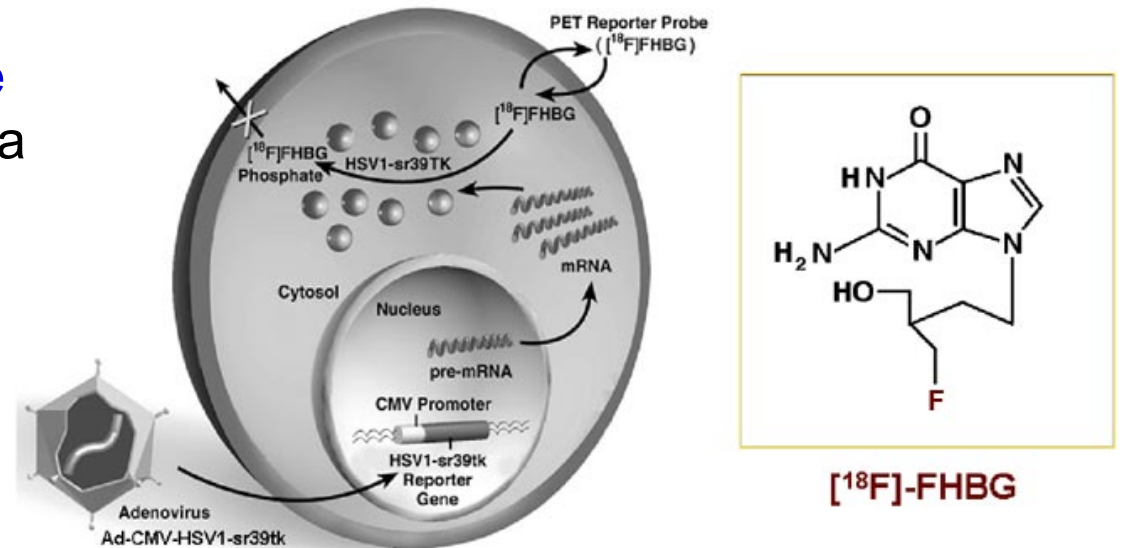
-Phosphorylation d'une prodrogue radiomarquée administrée après la transgénèse

-**Accumulation** de la prodrogue phosphorylée dans les cellules transfectées

- **Détection *in vivo*** par TEP de la radioactivité présente dans les cellules transfectées

-Exemples de prodrogues radiomarquées :

Enzyme Based PET Reporter Gene Imaging



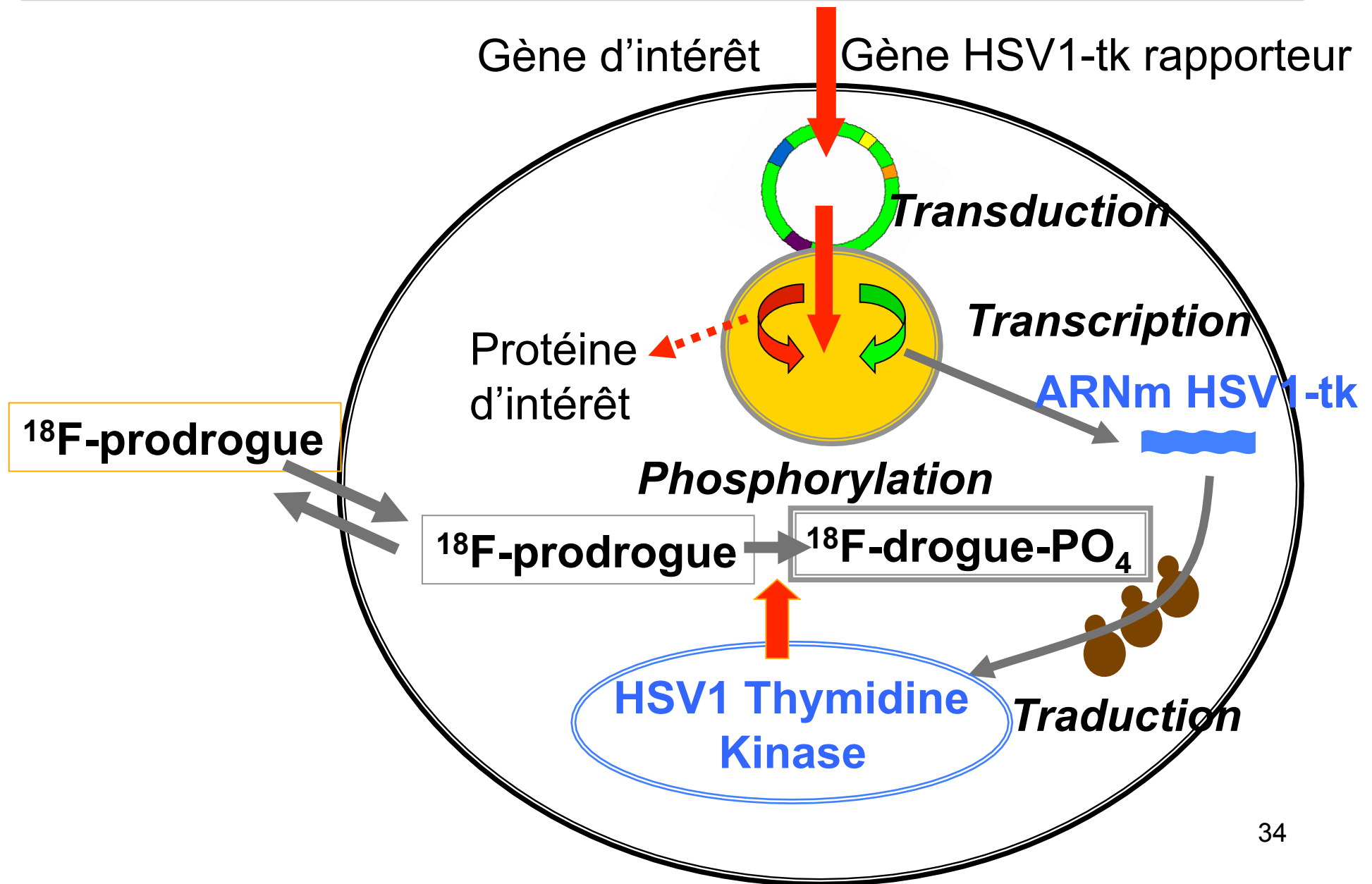
Dérivés de la guanosine

^{18}F -Fluoroganciclovir
 ^{18}F -FHPG
 ^{18}F -FHBG

Dérivés de l'uracile

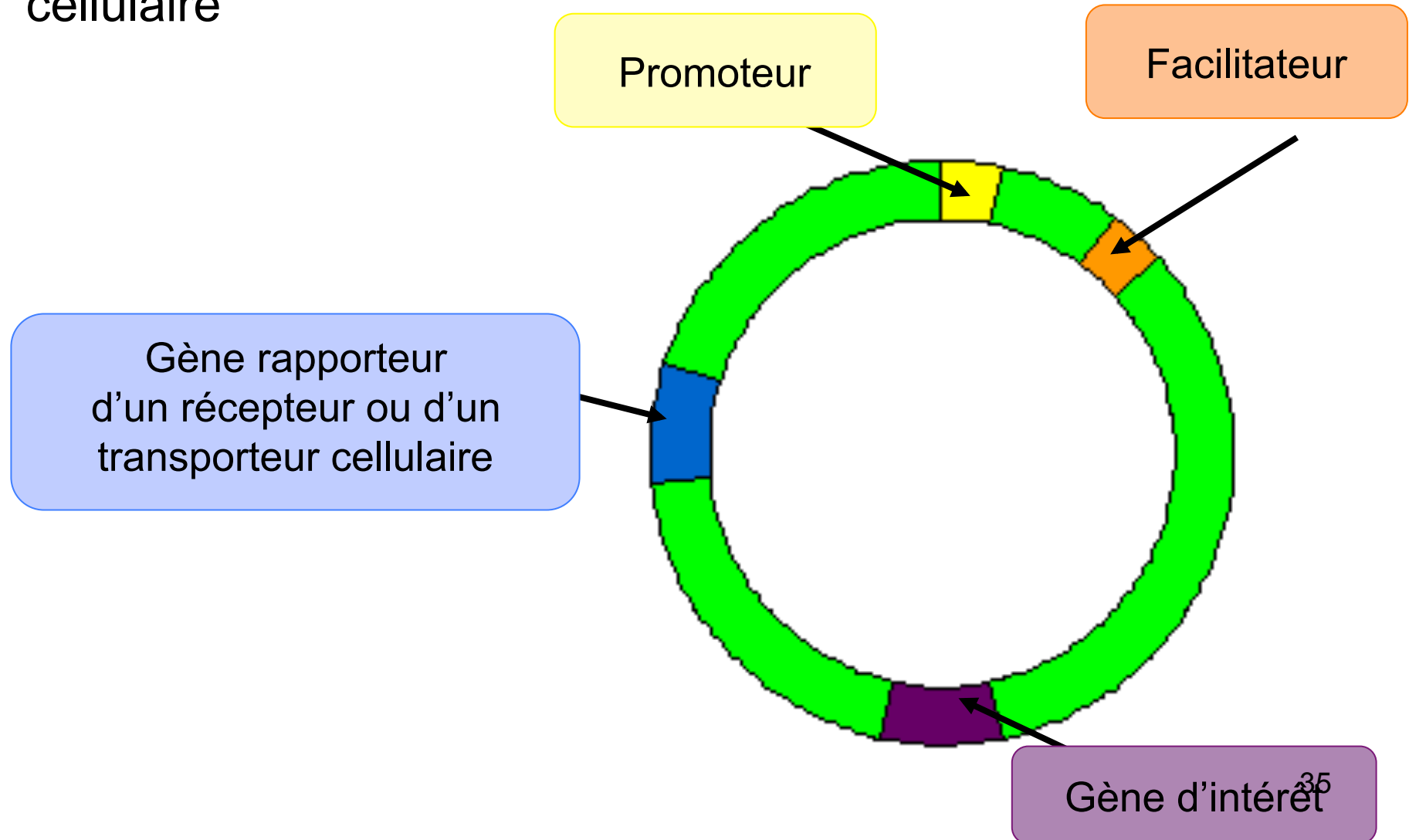
^{124}I -FIAU
 ^{18}F -FMAU

II- 4 Tomographie Emission de Positons



II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

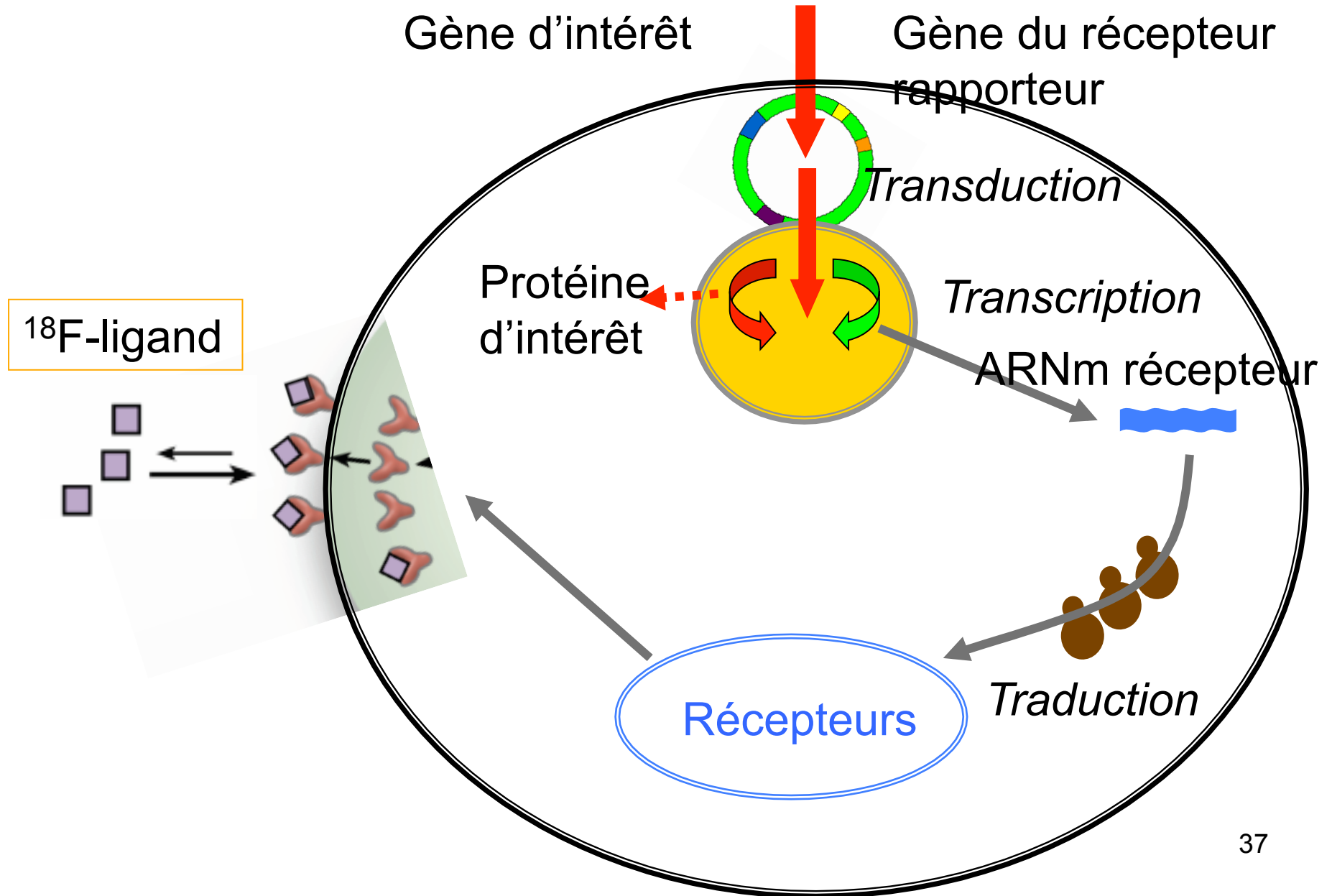
b- ligand radiomarqué d'un récepteur ou d'un transporteur cellulaire



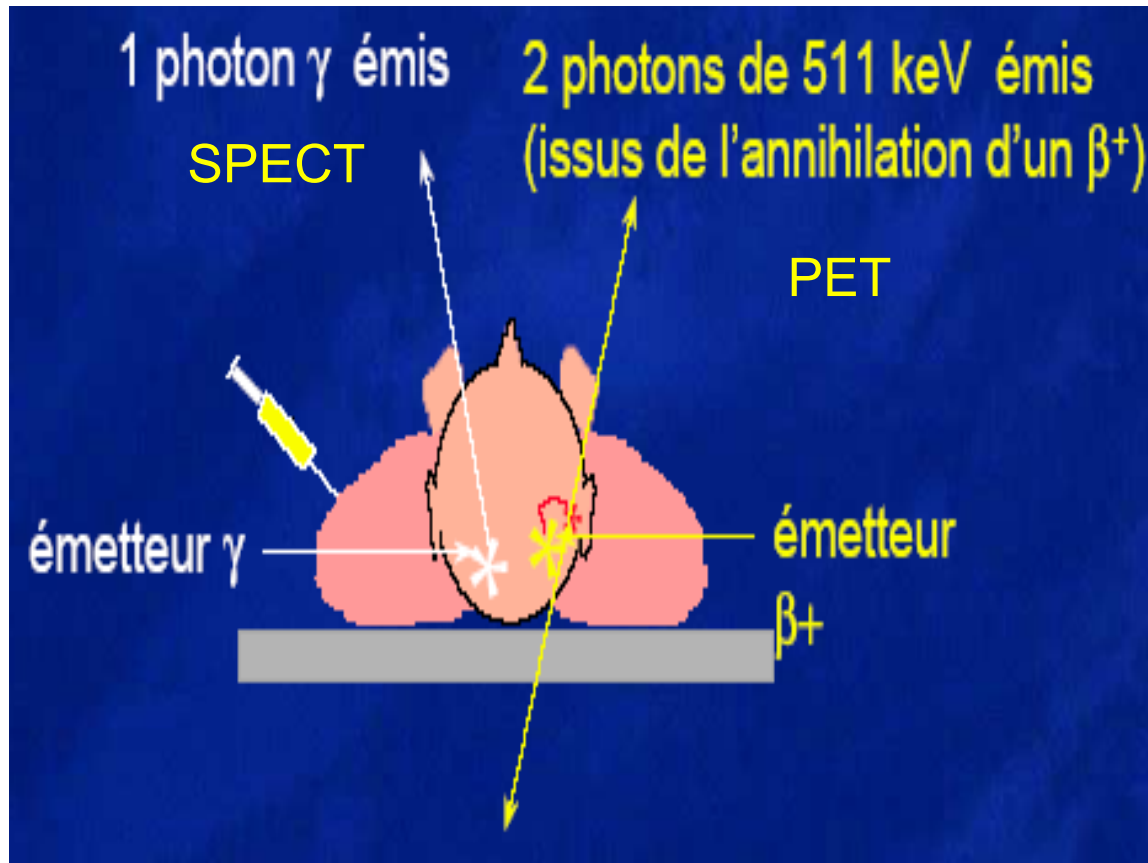
II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

- Expression de la synthèse des récepteurs :
 - Formation de récepteur protéique sur la membrane cytoplasmique des cellules transfectées
 - Fixation sur les récepteurs de ligands radiomarqués
 - Détection *in vivo* par TEP ou SPECT de la radioactivité présente sur les récepteurs des cellules transfectées
- Exemple de systèmes récepteur-ligand radiomarqués :
 - Récepteur Dopamine D2 et
 - ^{11}C -raclopride
 - ^{18}F -FluoroEthylSpiPérone
 - ^{123}I -IBZM

II- 4 Tomographie Emission de Positons



II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique



Emetteurs β^+ :

^{11}C , ^{15}O , ^{18}F , ^{13}N , ^{82}Rb ,
 ^{64}Cu , ^{68}Ga

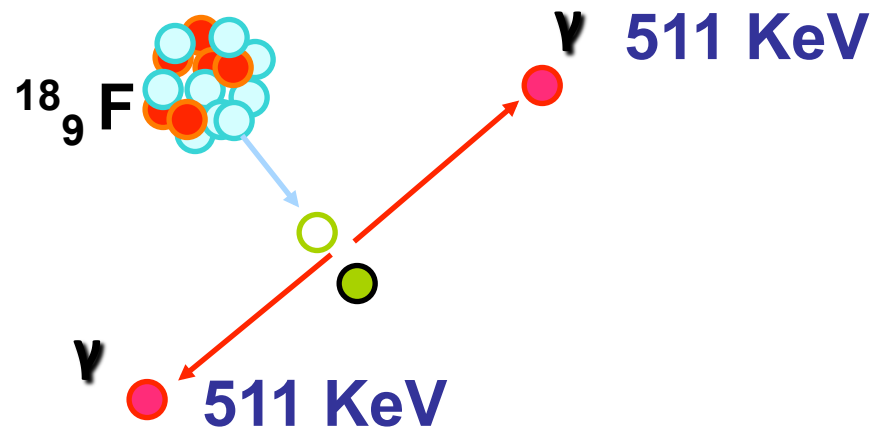
Période très courte (s, mn)
sauf le ^{18}F et ^{82}Rb

Emetteurs γ unique:

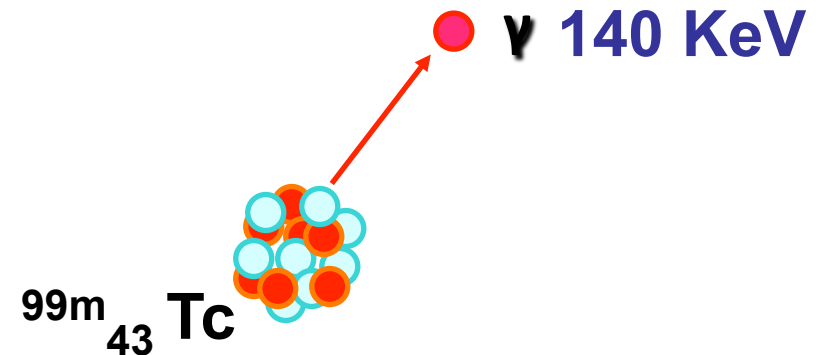
$^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Th , ^{123}I , ^{131}I

II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

Emetteurs β^+ : trajet long
 \Rightarrow détectés par Tomographe à Emission de Positons



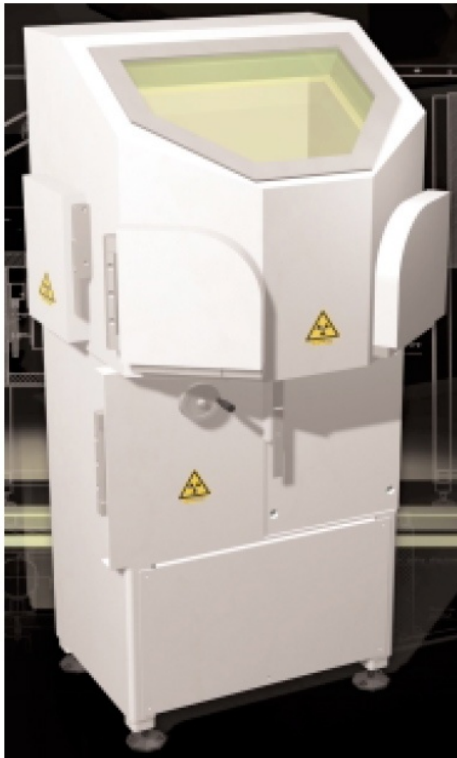
Emetteurs γ unique: trajet long
 \Rightarrow détectés par g-caméras ou Tomographe à Emission MonoPhotonique



II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

Emetteurs β^+

⇒ hautes énergies (511 keV)

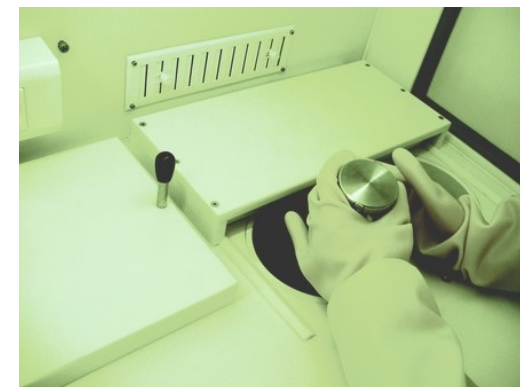


Emetteurs γ unique

⇒ basse énergie (< 300 keV)



Laboratoire de
marquage et de
préparation à l'hôpital,
enceintes plombées



II- 4 Tomographie Emission de Positons/Photon γ unique

Emetteurs β^+

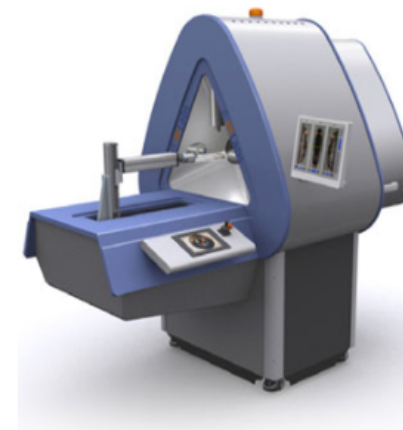


nanoPET-CT (Bioscan)

Emetteurs γ unique

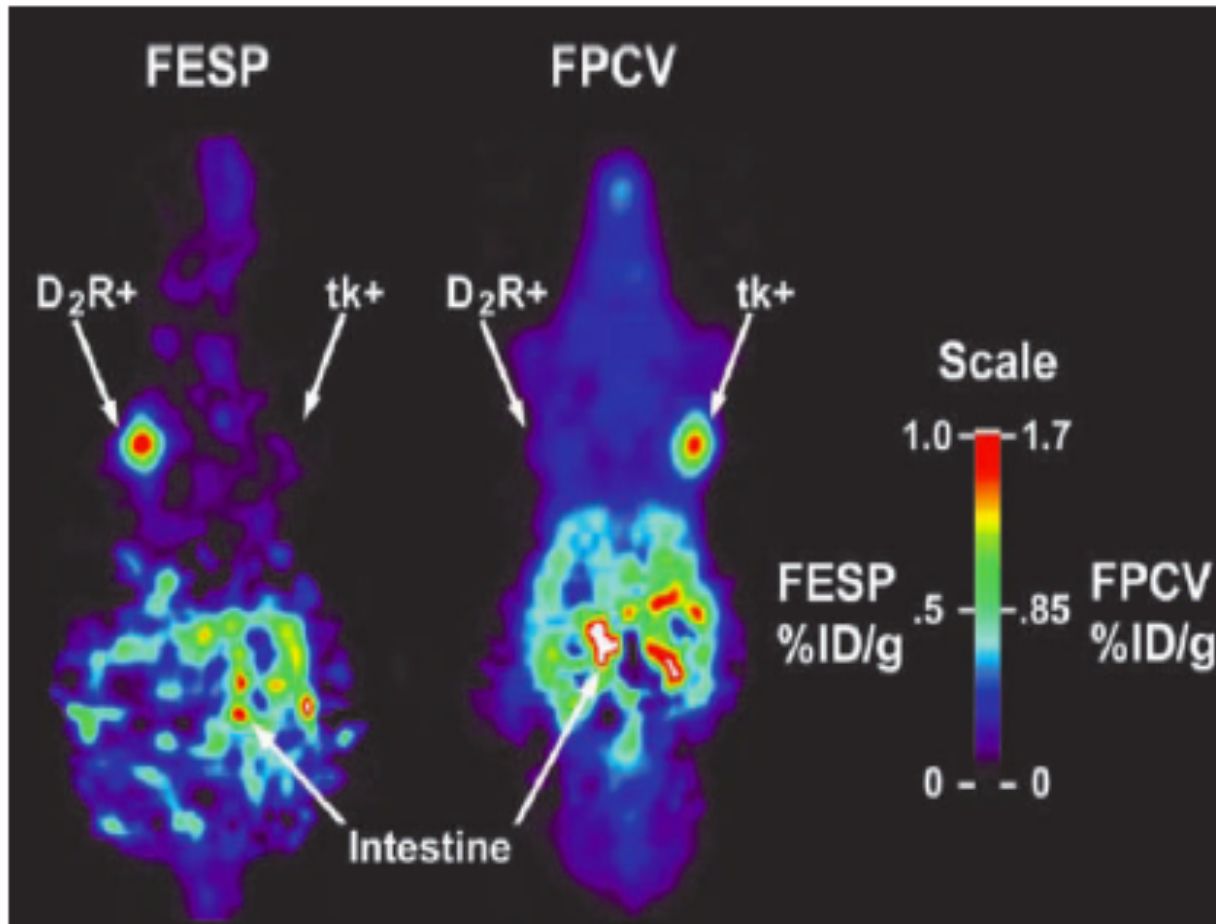


b



μ SPECT-CT
(MILabs)

II- 4 Tomographie Emission de Positons



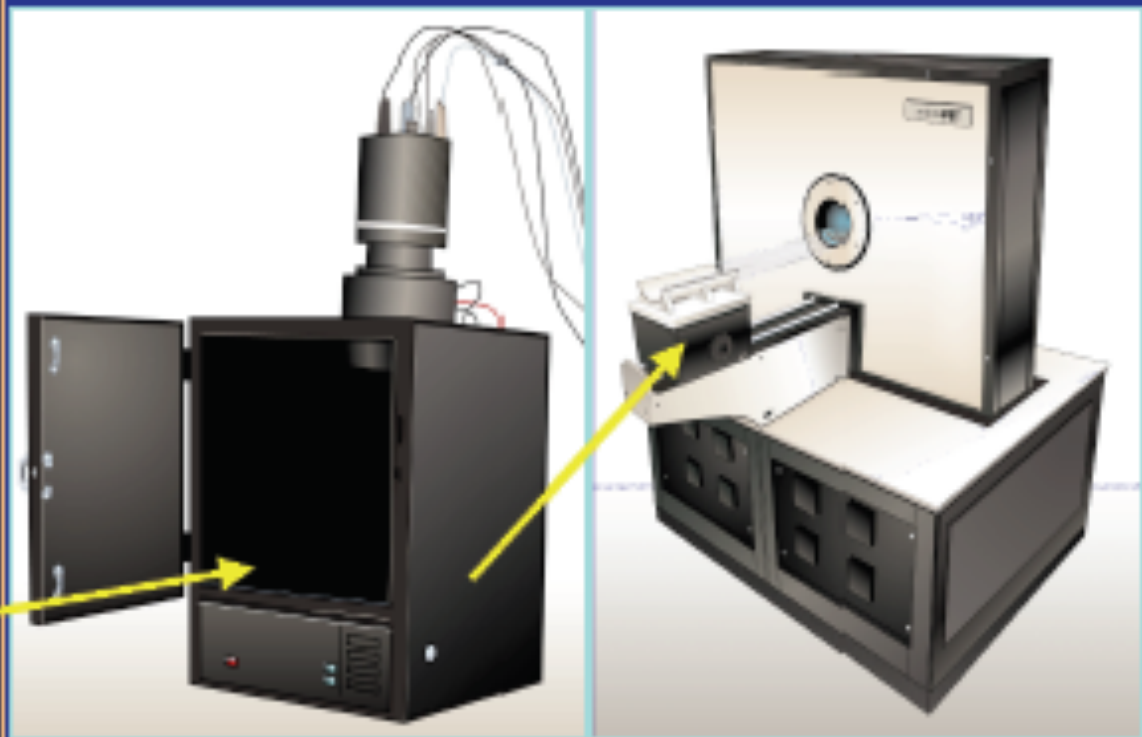
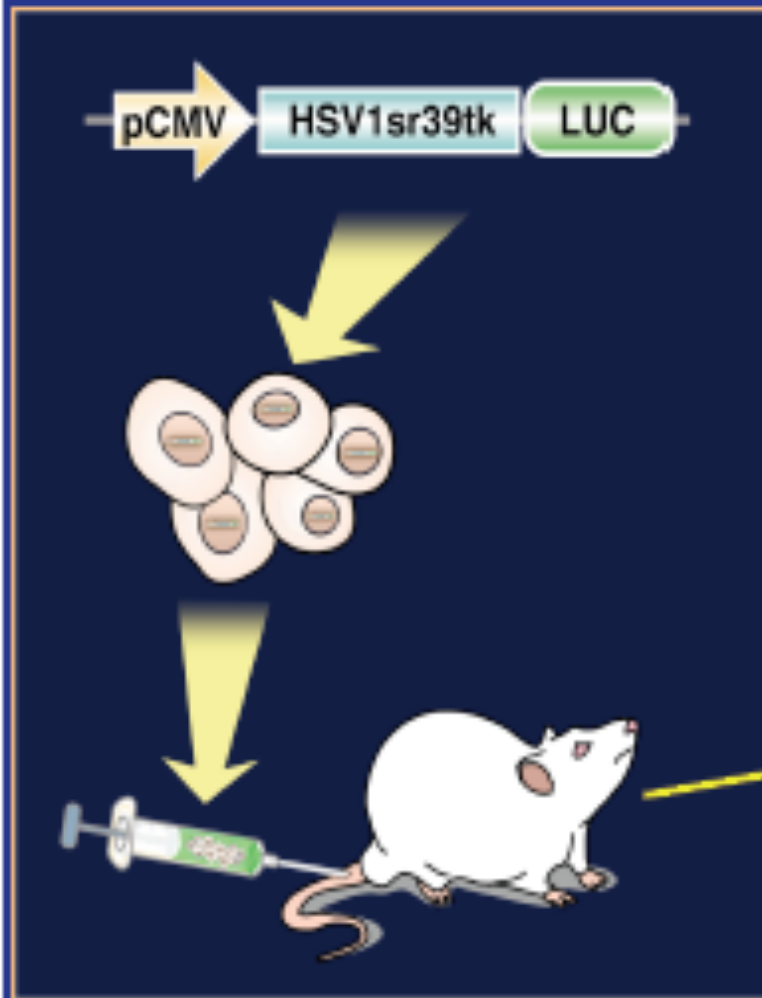
FPCV = ^{18}F -peniciclovir Prodrogue

FESP = ^{18}F -3-(2-fluoroethyl)piperone

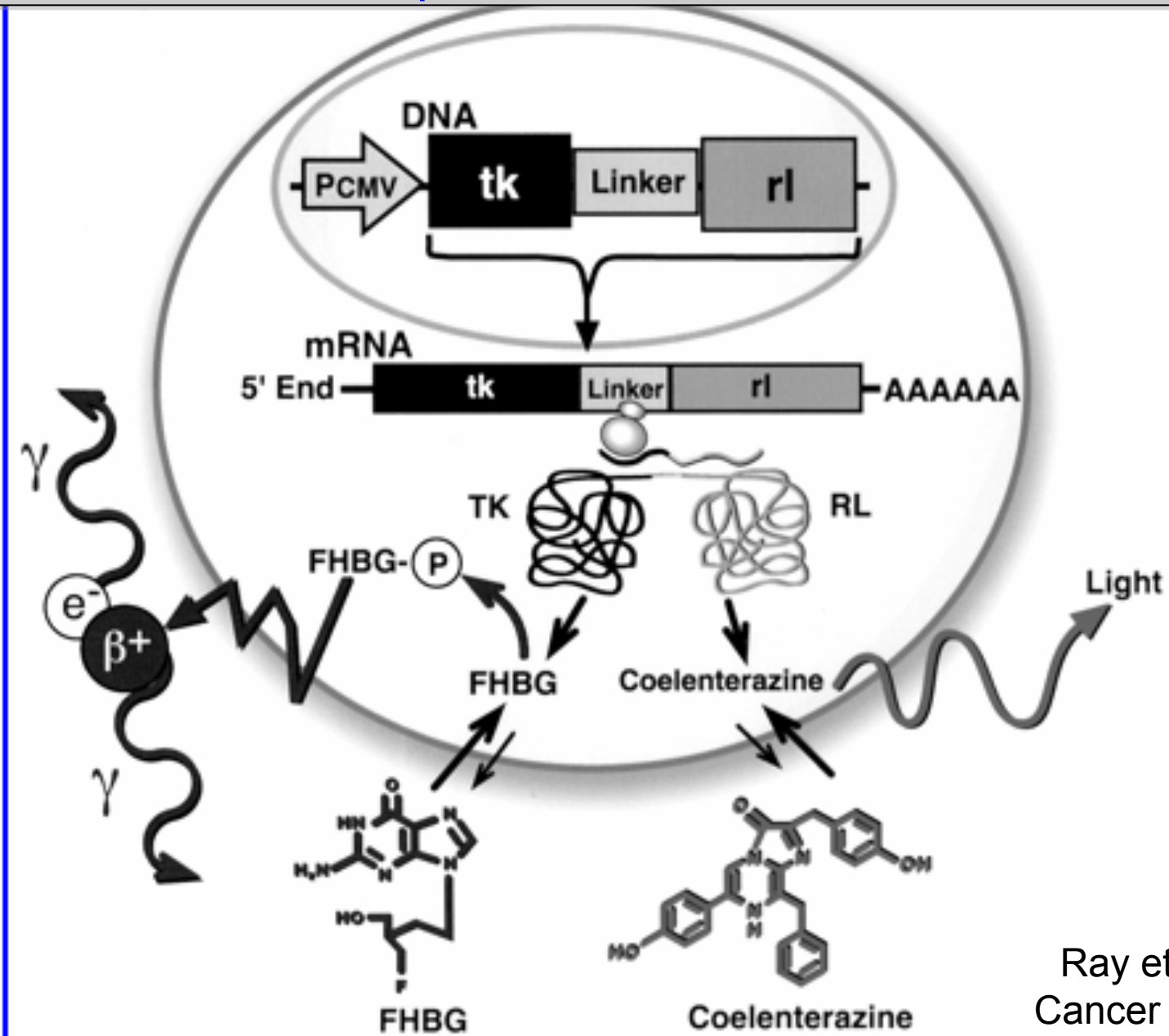
Ligand récepteur⁴²D₂

II- 5 Détection associant plusieurs méthodes

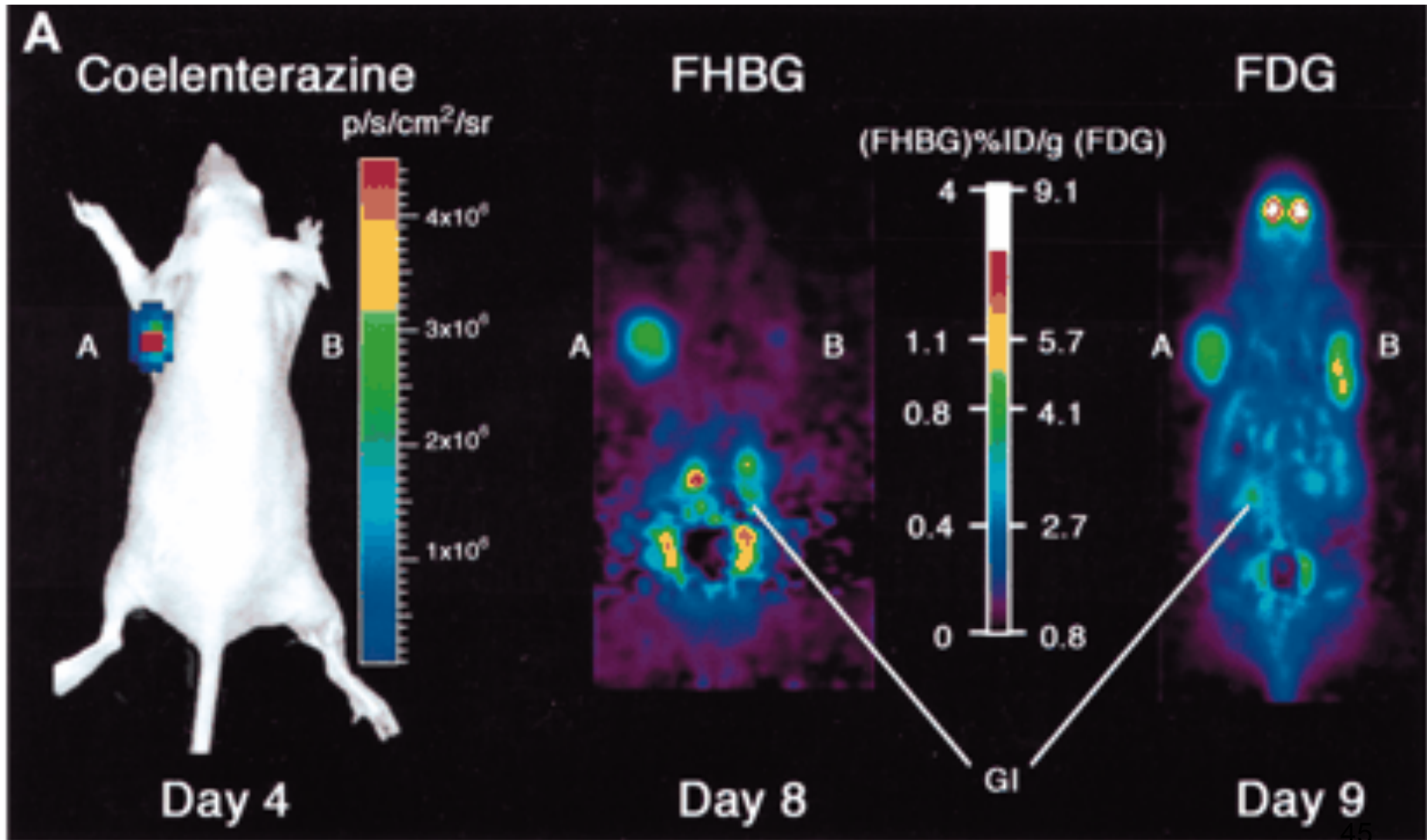
Optical & microPET Imaging



II- 5 Détection associant plusieurs méthodes



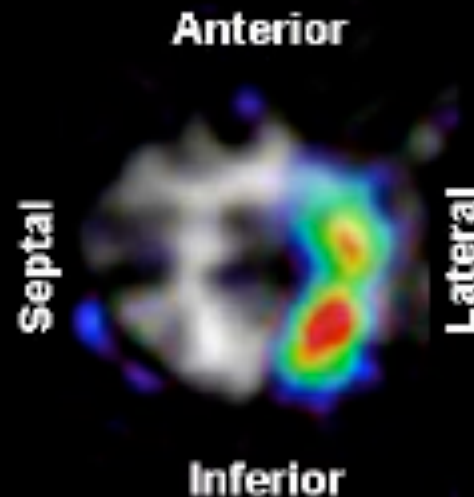
II- 5 Détection associant plusieurs méthodes



Ray et al. 2003 Cancer Research.

microPET/Optical Imaging of Cardiac Gene Delivery

LEFT VENTRICLE



m PET
(transverse image)

WHOLE BODY - RAT

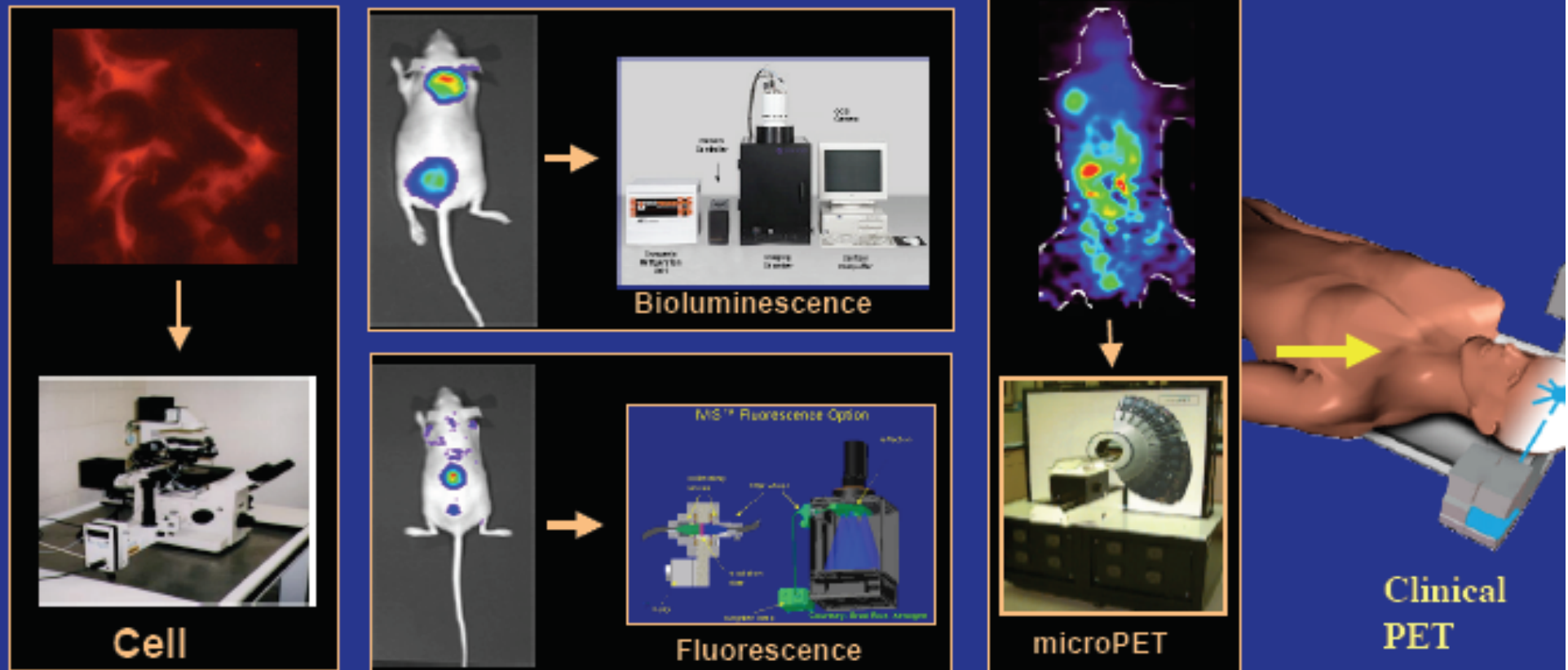


OPTICAL
(projection image)

J Wu et. al.
Circulation (2002)

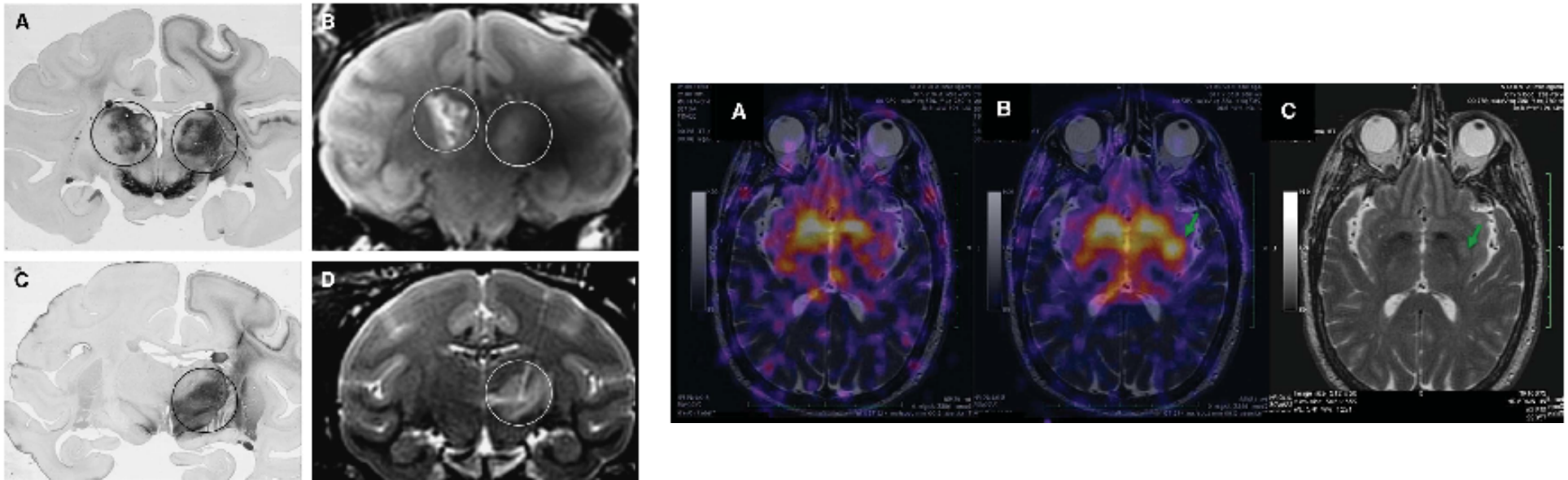
II- 5 Détection associant plusieurs méthodes

Tri-fusion Multimodality Reporters



II- 5 Détection associant plusieurs méthodes: passage à l'humain

[18F]-6-fluoro-l- meta-tyrosine (FMT)



Coupes histologiques de 2 PNH qui ont reçu un virus adéno-associé portant le gène de l'hAADC dans le thalamus et les 2 images IRM en T2 correspondantes. Signal de l'expression moindre à droite (B) dû au délai de 2h (temps pour terminer la 1^{ère} injection)

Images axiales d'un patient PK qui a reçu injection intraputaminale droite IRM-guidée de AAV2-hAADC. Images de fusion IRM-TEP (A) avant et (B) 1 mois après injection.

III Autre application: imagerie des thérapies cellulaires

La thérapie cellulaire → remplacer des cellules anormales ou disparues par des cellules saines (greffon):

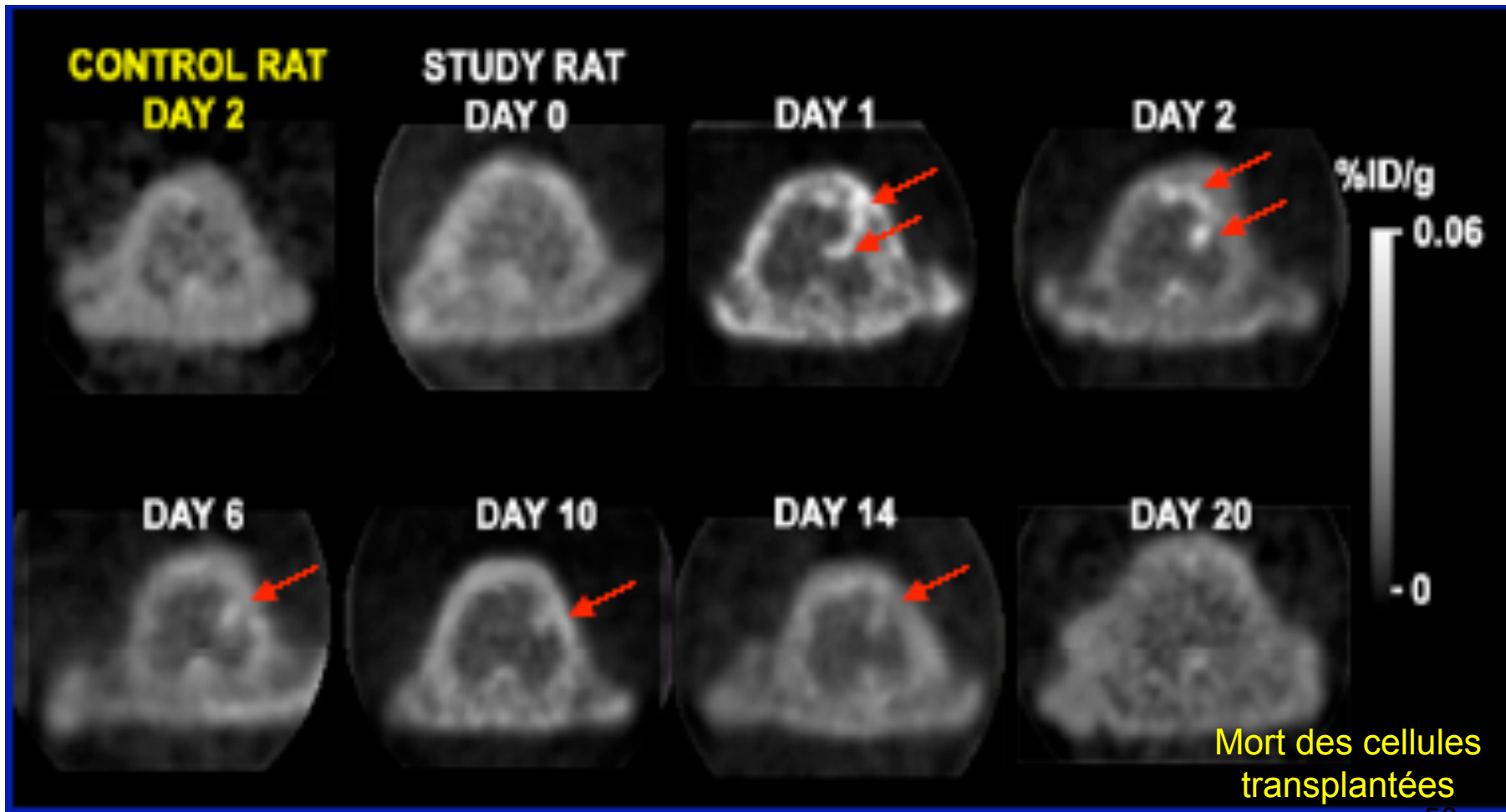
- prélevées chez un donneur sain = greffe allogénique
- prélevées à partir du patient ou de l'animal lui-même = greffe autologue.

Le greffon peut subir une manipulation en laboratoire (sélection ou déplétion de certaines populations cellulaires, transgénèse) et est ensuite réinjecté chez le patient ou l'animal.

Perspectives : traitement de certains cancers (sang, foie...), du diabète, des maladies liées à la dégénérescence (Alzheimer, Parkinson...), des brûlures et maladies de peau... ⁴⁹

III Imagerie des thérapies cellulaires

Suivi d'une transplantation intracardiaque de cardiomyoblastes embryonnaires exprimant HSV1-tk (PET)

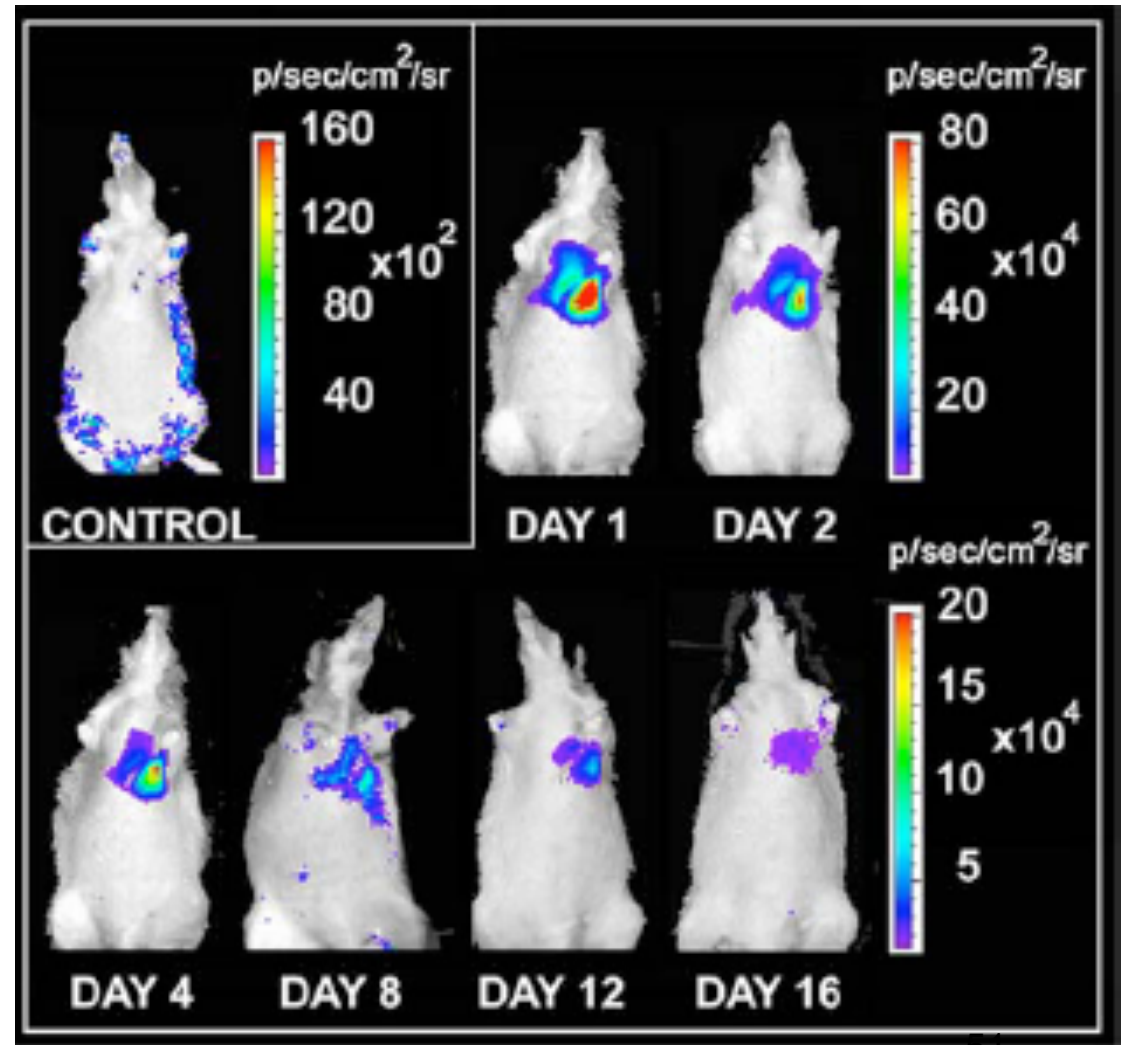


Contrôle = pas de gène rapporteur

Wu et al., 2007

III Imagerie des thérapies cellulaires

Transplantation
intracardiaque de
cardiomyoblastes
embryonnaires exprimant
la luciférase
(bioluminescence)



Contrôle = pas de gène rapporteur

Wu et al., 2007