

Vers une imagerie RPE du vivant

Résumé Ces dernières années, la RPE *in vivo* et l'imagerie RPE ont connu un nouvel essor. Il a été démontré que des mesures chez des animaux vivants pouvaient offrir de nouvelles perspectives en physiologie, physiopathologie, pharmacologie, oncologie, cardiologie, neurosciences et toxicologie. L'imagerie de composés paramagnétiques est rendue possible grâce à l'utilisation d'intenses gradients de champs magnétiques. Les premières études cliniques sont en cours chez l'homme avec des applications en dosimétrie rétrospective, oxymétrie et caractérisation de mélanomes.

Mots-clés RPE, *in vivo*, clinique, oxygène, radicaux libres, dosimétrie.

Abstract Towards an EPR imaging of the living

In the last few years, outstanding developments have been achieved in *in vivo* EPR and EPR imaging. It has been demonstrated that EPR measurements in living animals (*in vivo* EPR) can provide new insights to physiology, pathophysiology, pharmacology, oncology, cardiology, neuroscience and toxicology. Imaging of paramagnetic compounds can be achieved using strong magnetic field gradients. First clinical studies are ongoing in humans with applications in retrospective dosimetry, oximetry and melanoma characterization.

Keywords EPR, *in vivo*, clinical oxygen, free radicals, dosimetry.

Bien que la RPE et la RMN aient été découvertes à la même époque il y a environ cinquante-cinq ans, les applications biomédicales et médicales de la RMN et de l'IRM ont connu jusqu'ici un développement beaucoup plus impressionnant que celui de la RPE. Nous présentons dans cet article des solutions qui ont été trouvées pour répondre aux contraintes imposées par le développement de la RPE *in vivo*, ainsi que quelques applications majeures où la RPE s'avère être un outil unique dans la recherche biomédicale et pharmaceutique, avec de potentielles applications cliniques.

Le cahier des charges pour la RPE *in vivo*

Réaliser une expérience de spectroscopie ou d'imagerie RPE *in vivo* représente un défi dû à quatre contraintes principales. La première est liée aux ondes électromagnétiques employées en RPE, situées dans la gamme des micro-ondes. Alors que les spectromètres RMN opèrent le plus souvent dans le domaine des fréquences radio (centaines de MHz), les spectromètres RPE classiques opèrent à une fréquence proche de 10 GHz. Or l'eau, qui constitue la majeure partie de la matière vivante (environ 70 %), n'est pas transparente aux micro-ondes. À cette fréquence, l'onde électromagnétique est absorbée dans quelques millimètres d'eau et conduit à un échauffement local de l'échantillon (un phénomène lié à la permittivité de l'onde dans le milieu). Il a fallu attendre le développement de spectromètres opérant à plus basse fréquence (1 GHz ou moins) pour permettre des applications chez le petit animal, avec une pénétration des micro-ondes d'au moins 1 cm dans les tissus. La deuxième difficulté est de réaliser des mesures sur un animal vivant, tout en restant dans les conditions de résonance malgré les mouvements internes de l'animal. Grâce aux développements de résonateurs RPE innovants avec rétrocontrôle de la cavité, il est maintenant possible de stabiliser les conditions de résonance et d'opérer des mesures sur échantillons vivants malgré les mouvements physiologiques.

La troisième contrainte est liée à la nature des entités chimiques détectables en RPE qui doivent être paramagnétiques. Hormis le cas particulier de la mélanine qui possède

une concentration en radical suffisamment haute pour pouvoir être directement détectée *in vivo* [1], les autres espèces paramagnétiques ne peuvent être enregistrées par RPE que dans des conditions particulières. En effet, les radicaux impliqués en toxicologie (radical hydroxyle, anion superoxyde, etc.) ont des temps de demi-vie trop courts pour s'accumuler en quantité suffisante afin d'être détectable *in vivo*. Un cas particulier est celui de la détection de radicaux stables radio-induits dans l'émail dentaire ou les tissus osseux et qui peut être utilisée pour quantifier la dose reçue par une personne exposée à une irradiation accidentelle (voir l'article de F. Trompier p. 30). D'autres radicaux pouvant également être détectés *in situ* comprennent ceux piégés dans des matrices solides, tels que ceux provenant des phénomènes de polymérisation des résines dentaires ou des ciments osseux. Toutefois, la majorité des expériences menées jusqu'ici en RPE *in vivo* a nécessité l'administration d'espèces paramagnétiques exogènes, comme les radicaux stables de type nitroxyde et tétrathiatriarylméthyl (ou trityle) (voir l'article de O. Ouari *et coll.* p. 9) [2]. D'un point de vue chimique, d'importantes modulations structurales ont été réalisées afin de conférer à ces composés paramagnétiques des spectres RPE sensibles à leur environnement, pour mesurer le taux d'oxygénation, le pH ou le statut redox, autant de paramètres essentiels en physiologie et physiopathologie [3]. Ces agents de contraste sont appelés « intelligents », car au-delà de la visualisation de leur biodistribution dans l'organisme, ils donnent une information importante sur l'environnement dans lequel ils se distribuent.

La dernière contrainte est liée aux temps de relaxation électronique qui sont environ mille fois plus courts que les temps de relaxation nucléaire. Comme conséquence, la largeur d'une raie RPE est mille fois plus importante que la largeur d'un pic RMN. Or l'imagerie par résonance magnétique est basée sur l'application de gradients de champ magnétique suffisamment intenses pour pouvoir différencier deux produits de même nature dans l'espace. Ainsi, il faut utiliser des gradients beaucoup plus intenses en imagerie RPE (0,5 à 2 T/m) qu'en IRM (quelques dizaines de mT/m). Ceci justifie également le



Figure 1 - Spectromètre RPE à usage clinique installé à Bruxelles. L'entrefer de 60 cm permet le positionnement d'un patient. Ce spectromètre opère à une fréquence de 1 GHz. Sur la droite : l'antenne de surface, placée au-dessus de la zone d'intérêt pour l'analyse RPE. Un appareil équivalent a été installé à Paris début 2019.

recours aux radicaux trityle dont la largeur de raie est relativement étroite (0,01 mT) pour les applications en imagerie RPE.

Spectromètres RPE *in vivo* ou clinique

Même s'il s'agit d'un marché de niche – au niveau mondial, seulement une dizaine de groupes de recherche sont actifs actuellement dans le domaine de la RPE *in vivo* –, des appareils sont commercialisés par différentes firmes. Ces appareils commerciaux (spectromètres et imageurs) opèrent généralement à 1 GHz pour un champ magnétique variable autour de 50 mT. Ils sont généralement équipés d'une cavité résonante permettant le positionnement de l'animal ou d'une antenne de surface sous forme de boucle. Il est souvent intéressant de comparer, voire de superposer, l'image RPE à une image obtenue par une autre méthodologie telle que le CT-scanner ou l'IRM [4-5]. Actuellement, seuls cinq appareillages (Hanover, Bruxelles, Atlanta, Morgantown, Paris) permettent le positionnement d'un patient dans l'aimant (un est cours d'installation à Chicago) (figure 1). Il existe également des versions plus compactes permettant le positionnement de la tête dans le spectromètre en vue de réaliser des mesures sur des dents pour des applications dosimétriques.

Applications de la RPE *in vivo*

À titre illustratif et non exhaustif, citons la caractérisation du statut redox des tissus ainsi que la détection d'espèces radicalaires importantes en physiologie ou en toxicologie telles que les espèces réactives de l'oxygène. Le domaine qui a incontestablement connu le plus de succès est celui de la mesure de l'oxygénation tissulaire. Bien que l'oxygène soit un bi-radical, il ne peut pas être directement détecté par RPE dans les tissus, mais il peut l'être de manière indirecte. En effet, sa présence modifie notablement les temps de relaxation électronique (en pratique, la largeur de raie RPE) d'espèces paramagnétiques stables telles que la phtalocyanine de lithium ou des nanoparticules de charbon (figure 2) [6]. Une fois ces espèces administrées dans un tissu, des mesures d'oxygénation peuvent être répétées sur de longues périodes (mois, années) sur le même

site d'intérêt avec une très haute sensibilité (des variations de l'ordre du mmHg peuvent être détectées), avec des applications principalement oncologique, vasculaire, cardiologique, neurologique et pour la cicatrisation de plaies [7-8]. L'oxymétrie par RPE est un outil unique pour l'étude de l'activité de nouvelles thérapies modulant l'oxygénation tissulaire chez le même patient.

Un autre paramètre faisant l'objet d'intéressants développements est la mesure du pH extracellulaire car il est directement lié à l'agressivité tumorale. Sa mesure non invasive par RPE *in vivo* permet ainsi d'identifier l'action de médicaments modulant ce paramètre. La mesure de pH, couplée aux mesures de microviscosité grâce à l'utilisation de nitroxyde de type imidazolidinoxyle, permet d'étudier *in vivo* les phénomènes de relargage de médicaments à partir de formes pharmaceutiques à libération prolongée. D'autres recherches ont démontré la capacité de la RPE *in vivo* à détecter la mélanine. Les pigments mélaniques sont des macromolécules radicalaires dont la raie est suffisamment étroite pour pouvoir être imagée par RPE [1]. Des études sur modèles animaux ont montré que l'image RPE était directement superposable aux coupes histologiques obtenues après prélèvement des tissus.

Recherches en RPE clinique

Les premières études sur patients ont porté sur la mesure répétée de l'oxygénation tumorale car l'oxygène est un paramètre clé de la réponse aux traitements, en particulier la radiothérapie. Dans ce cadre, les premières études cliniques visent à étudier de manière répétée chez le même patient la pO_2 tumorale et ses modifications en cours de traitement. Grâce à ces connaissances, il sera alors possible de rationaliser le schéma thérapeutique à employer. Un autre domaine d'application de l'oxymétrie RPE chez le patient est le suivi de l'oxygénation du pied diabétique (problème d'ulcération en lien avec l'hypoxie locale). Enfin, une étude clinique est en cours à Bruxelles en vue d'évaluer l'apport potentiel de la RPE clinique dans la caractérisation du mélanome et de son invasion tissulaire (*via* la mesure du contenu en mélanine).

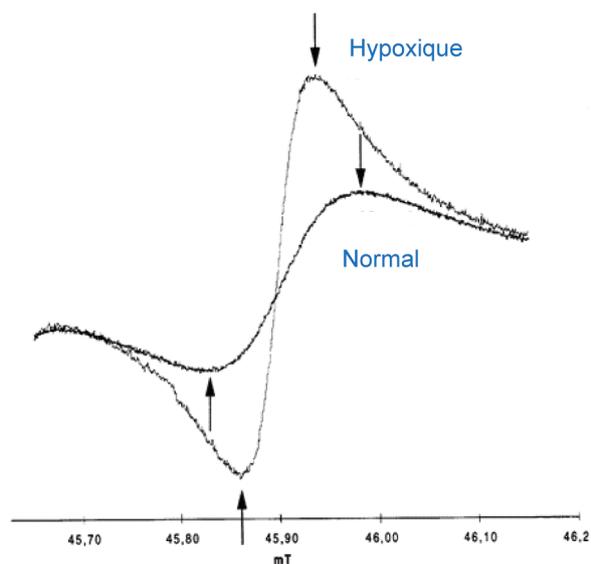
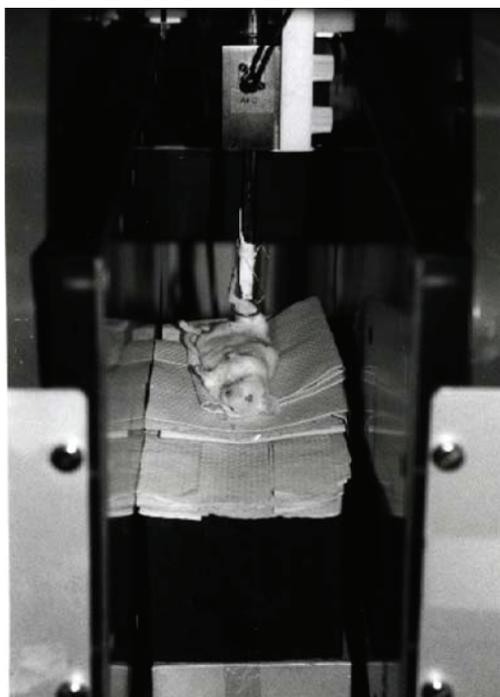


Figure 2 - **Expérience d'oxymétrie RPE *in vivo***. À gauche : souris anesthésiée placée dans un aimant RPE avec muscle placé au centre d'une antenne de surface. À droite : spectres RPE d'un muscle normal et d'un muscle hypoxique. Noter la variation de largeur de raie reflétant l'état d'oxygénation du tissu.

L'apport de la chimie et des mathématiques aux futurs développements

Comme explicité ci-dessus, la RPE nécessite bien souvent l'administration de molécules permettant d'obtenir un signal : ces sondes moléculaires (trityle, radicaux aminoxyle) sont l'équivalent des agents de contraste utilisés dans d'autres méthodes d'imagerie médicale (IRM, TEP, échographie...). De grands progrès peuvent être réalisés concernant l'optimisation des propriétés spectrales : concevoir des composés avec un signal RPE simple et une largeur de raie étroite pour une utilisation optimale en imagerie RPE, améliorer leur stabilité *in vivo* pour augmenter la fenêtre temporelle durant laquelle les mesures peuvent être répétées, concevoir des composés dont le spectre est dépendant d'un ou plusieurs paramètres pour élargir les champs d'applications, et enfin améliorer leur biocompatibilité pour des applications cliniques. Le traitement du signal et la gestion des données (comme la transformation des données spectrales en images) sont également des éléments clés pour l'obtention d'information robuste et significative. C'est le cas par exemple de l'utilisation de méthodes de maximum de vraisemblance pour obtenir des incertitudes correctes sur une donnée [9], ou de méthodes traitant des problèmes inverses pour obtenir des données fiables avec moins de points, donc plus rapidement [10]. La collaboration entre mathématiciens et spectroscopistes pourrait conduire à des progrès notables dans ce domaine.

À quand l'utilisation clinique ?

C'est grâce à une combinaison de développements instrumentaux (aimants/résonateurs) et chimiques (sondes RPE intelligentes) que la RPE a pu être appliquée *in vivo* comme outil unique dans les domaines physiologiques, pharmacologiques et toxicologiques. Le défi actuel porte sur la transposition clinique de ces recherches, maintenant rendues possibles grâce à l'implémentation d'instruments de RPE clinique. De nombreux progrès portant sur le développement des agents

de contraste et le post-traitement du signal seront encore cruciaux pour aboutir à une utilisation clinique de routine de la RPE.

- [1] Vanea E. *et al.*, Molecular electron paramagnetic resonance imaging of melanin in melanomas: a proof-of-concept, *NMR Biomed.*, **2008**, *21*, p. 296.
- [2] Abbas K. *et al.*, In vivo triarylmethyl radical stabilization through encapsulation in Pluronic F-127 hydrogel, *J. Magn. Reson.*, **2016**, *270*, p. 147.
- [3] Boutier-Pischon A., Auger F., Noël J.-M., Almario A., Frapart Y.-M., EPR and electrochemical quantification of oxygen using newly synthesized para-silylated triarylmethyl radicals, *Free Radical Research*, **2015**, *49*, p. 236.
- [4] Beziere N. *et al.*, First combined in vivo X-ray tomography and high-resolution molecular electron paramagnetic resonance (EPR) imaging of the mouse knee joint taking into account the disappearance kinetics of the EPR probe, *Mol. Imaging*, **2012**, *11*, p. 220.
- [5] Danhier P., Gallez B., Electron paramagnetic resonance: a powerful tool to support magnetic resonance imaging research., *Contrast Media Mol. Imaging*, **2015**, *10*, p. 266.
- [6] Gallez B., Baudelet C., Jordan B.F., Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications, *NMR Biomed.*, **2004**, *17*, p. 240.
- [7] Gallez B., Neveu M.A., Danhier P., Jordan B.F., Manipulation of tumor oxygenation and radiosensitivity through modification of cell respiration: a critical review of approaches and imaging biomarkers for therapeutic guidance, *Biochim. Biophys. Acta*, **2017**, *1858*, p. 700.
- [8] Desmet C.M., Prétat V., Gallez B., Nanomedicines and gene therapy for the delivery of growth factors to improve perfusion and oxygenation in wound healing, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, *129*, p. 262.
- [9] Tran Duc N., Frapart Y.-M., Li Thiao-Té S., Estimation of spectrum parameters for quantitative EPR in the derivative limit, *IEEE*, **2017**, doi: 10.1109/ATC.2017.8167620.
- [10] Durand S., Frapart Y.-M., Kerebel M., Electron paramagnetic resonance image reconstruction with total variation and curvelets regularization, *Inverse Problem*, **2017**, *33*, p. 114002.

Yves FRAPART*

Ingenieur de recherche au CNRS, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS/Université Paris Descartes, Paris.

Bernard GALLEZ,

Professeur à l'Université Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Bruxelles (Belgique).

* yves.frapart@parisdescartes.fr