



La caractérisation de la mutation IDH1R¹³²H dans un modèle de gliome humain de haut grade par imagerie multimodale, une étude translationnelle in vitro et in vivo

Alexandra Clement

► To cite this version:

Alexandra Clement. La caractérisation de la mutation IDH1R¹³²H dans un modèle de gliome humain de haut grade par imagerie multimodale, une étude translationnelle in vitro et in vivo. Imagerie. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0213 . tel-03230083

HAL Id: tel-03230083

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03230083>

Submitted on 19 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Alexandra CLEMENT**

La caractérisation de la mutation IDH1^{R132H} dans un modèle de gliome humain de haut grade par imagerie multimodale, une étude translationnelle *in vitro* et *in vivo*

Le 11 Décembre 2020

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Aurélie KAS	Professeur, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Université de la Sorbonne, Paris
	Dr Monique DONTENWILL	Directrice de recherche, Laboratoire de Bioimagerie et de Pathologies, Université de Strasbourg, Ilkirch
Examineurs :	Pr Karl-Josef LANGEN	Professeur, Institut des Neurosciences et de Médecine, Centre de Recherche, Juelich
	Pr Antoine VERGER	Professeur, Laboratoire d'Imagerie Adaptative Diagnostic et Interventionnelle, directeur de thèse, Université de Lorraine, Nancy
Membre invité :	Dr Marine BEAUMONT	Docteur, Laboratoire d'Imagerie Adaptative Diagnostic et Interventionnelle, Université de Lorraine, Nancy

LES REMERCIEMENTS

Merci aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'examen de mon travail de thèse.

À Madame le **Professeur Aurélie KAS (Université de la sorbonne, Paris)**, merci d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse et d'avoir pris le temps d'être rapporteur de ce travail. Merci pour votre expertise et vos conseils.

À Madame le **Docteur Monique DONTENWILL (Université de Strasbourg, Illkirch)**, merci d'avoir accepté et pris le temps de lire et analyser ce travail. Vos remarques pertinentes seront d'une grande aide pour la poursuite du projet. Merci.

À Monsieur le **Professeur Karl-Josef LANGEN (Institut des Neurosciences et de Médecine, Juelich)**, un grand merci à vous pour votre participation ces 3 dernières années, aux réunions de mon comité de suivi de thèse et de votre présence à ce jury. Vos conseils ont été des éléments clés pour avancer. Merci de votre patience et de votre compréhension malgré la barrière de la langue.

À Madame le **Docteur Marine BEAUMONT (Université de Lorraine, Nancy)**, tu as été actrice de ce travail ! Merci de ton implication, de tes idées et de ton aide pour cette collaboration à Grenoble.

À Monsieur le **Professeur Antoine VERGER (Université de Lorraine, Nancy)**, mon directeur de thèse. Merci d'avoir mené à bien ce projet colossal avec moi. Ton « œil » de clinicien avisé et ta passion de la recherche ont été essentiels dans la réflexion et dans l'acheminement de ce projet. Cela n'a pas été sans difficulté, avec beaucoup de rebondissements et il reste tant à faire mais je « pars » en toute confiance.

À Monsieur le **Professeur Gilles KARCHER**, merci pour l'acceptation de ce long projet et de l'investissement financier engendré. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le **Professeur Pierre-Yves MARIE**, merci pour votre intérêt scientifique porté à cette étude.

À Monsieur le **Professeur Jacques FELBLINGER**, merci d'avoir accepté que IADI soit mon laboratoire d'accueil. Soyez certain de ma profonde estime et de ma reconnaissance infinie.

Ce travail a été le fruit de nombreuses collaborations, que je tiens à remercier chaleureusement...

À l'ensemble de l'équipe **IADI** (INSERM U1254) et du **CIC-IT** (CHRU-Nancy U1433). Merci particulièrement à **Marine, Michelle** et **Gabriela** pour votre aide et votre disponibilité, sans oublier **les manipulateurs** IRM du mardi matin.

À l'ensemble de l'équipe **IRIMAGE** (GIN U1216). Un éternel merci à **Benjamin, Florence, Vasile** et **Nora** pour votre investissement dans ce projet. Ce fut un plaisir de venir à Grenoble et de découvrir votre plateforme d'imagerie. Merci pour cette belle collaboration.

À l'ensemble de l'équipe **BIOSIS** (CRAN U7039). Merci d'avoir accepté de partager vos locaux et votre savoir-faire. Merci particulièrement à **Alicia, Valérie** et **Julien** pour votre aide technique et scientifique. J'ai beaucoup appris avec vous.

À l'ensemble du personnel de **Biopathologie** (CHRU-Nancy), merci au **Professeur Guillaume GAUCHOTTE** et aux **techniciennes** pour leur travail. Merci au **Docteur Celso POUGET** pour son expertise et son dévouement dans ce projet.

À Monsieur le **Docteur Fabien RECH**, neurochirurgien (CHRU- Nancy), merci de votre intérêt et de votre participation à ce projet de recherche. Ce travail continue, en espérant que nos efforts porteront leurs fruits.

À l'ensemble de l'équipe **Nancyclotep** et au personnel du **Service de Médecine Nucléaire** (CHRU-Nancy), merci à vous.

Un remerciement particulier pour **Timothée (mon Timy)**, mon copain de thèse, mon confident et mon chauffeur de camion attitré ! Merci pour ton soutien et tes encouragements. Merci d'être là quand je ne trouve plus la force, ni le courage de supporter seule les difficultés. Nos petits-déjeuners vont me manquer... le cookie 3 chocolats du Relais-H aussi.

À **Matthieu (Matteo)**, ta bonne humeur est communicative, ton humour redonne le sourire (enfin surtout ton accent faussement américain...) et apaise les cœurs. J'ai toujours pu compter sur toi, merci d'être là ! Il y aura pleins d'autres « dernier verre de l'amitié ». *You know*.

À **Olga**, ma belle Olga, merci de m'avoir réconcilié avec la radiochimie. Tu es le rayon de soleil de Nancyclotep. Nous n'aurons plus l'occasion de faire du « gallium » ensemble mais cela restera une belle expérience avec toi.

À **Romain (Roro)**, que de rigolades avec toi. Tu es un sacré personnage, merci pour ton dynamisme sans faille dans ce projet. Attention aux churros tout de même !

À **Julien (Julian de la Pampa)**, mon autre copain de thèse. Eh oui j'ai dit « copain » ! Malgré tous les obstacles rencontrés durant nos thèses respectives, toi et moi nous y sommes arrivés...c'est ce qui nous lie. Je n'oublie pas l'aide que tu m'as apportée alors que toi-même tu étais en difficulté. Un grand merci.

À **Emilie**, merci de ta participation et d'avoir accepté de continuer ce projet, bon courage à toi !

À **Steeven**, merci d'avoir supporté mon incompetence en informatique. Peut-être qu'un jour je réussirai à organiser mon bureau qui sait...Merci à toi !

À **mes amies de Fac, Valérie-Anne et Alice**, plus de 10 ans d'amitié. C'est une chance de vous avoir à mes côtés et ce malgré la distance !

À **ma Clém**, que d'aventures et de fous rires, ton arrivée à Nancyclotep a été tellement rafraichissante. Tu es une personne lumineuse. À tous ces bons souvenirs et à ceux à venir. Merci d'être toi ! Merci de ton soutien !

À **mes amis Hervé et Arnaud**, mes deux anges gardiens de la recherche...

À **Hervé**, un homme et un maître de stage exceptionnel. C'est toi qui m'as donné le goût de la recherche. Merci de m'avoir suivie toutes ces années. Tu as toujours répondu présent pour moi, toujours à mes côtés ! Par ailleurs tu m'as presque vu grandir...(mais non tu n'es pas vieux... !). Je te dois tellement. J'ai aussi une pensée pleine d'émotion et de nostalgie pour **Lina**.

À **Arnaud**, la personne la plus bienveillante que je connaisse. Merci pour tout !

Vous êtes les Bonnie & Clyde d'IMOPA mais en mieux...

À toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce beau travail mais que je n'ai pas nommées. Merci !

À **ma famille** qui m'est si chère...

À **mes grands-pères Jean-Marie et René**, j'espère que vous serez fiers de moi.

À **mes frangines et bat's**, mes piliers ! Merci de m'avoir soutenue et donnée autant de courage. Merci de m'avoir tout simplement donnée confiance en moi !

À **Aurélie**, cette fin de thèse signe le début d'une nouvelle vie professionnelle, de notre projet entrepreneurial un peu fou de Gabin et Honorine. Je ne voyais personne d'autre que toi avec qui me lancer dans cette aventure ! J'y crois !

À **Elodie**, ta douceur et ton empathie est toujours un réconfort. Merci d'avoir été à l'écoute dans mes moments de doutes et d'incertitudes.

À **Alicia**, « ce n'est pas une flèche la petite » mais tellement attachante ! Merci pour tous ces fous rires !

À **ma nièce Emy et mon neveu Gabin**, mes amours, mes bonheurs je serai toujours là pour vous.

À **mon amour perdu...**

À **Gabin et Honorine**, une nouvelle page de ma vie...

LA TABLE DES MATIERES

LA LISTE DES TABLEAUX	5
LA LISTE DES FIGURES	6
LA LISTE DES ABBREVIATIONS	8
LA LISTE DES TRAVAUX ISSUS DE LA THESE	11
LES PUBLICATIONS DANS DES REVUES	11
LES PRESENTATIONS DANS LES CONGRES.....	11
LES COMMUNICATIONS ORALES.....	11
LE PREAMBULE	12
I. L'ETAPE <i>IN VITRO</i>.....	13
II. L'ETAPE <i>IN VIVO</i>.....	13
III. L'ETAPE <i>EX VIVO</i>.....	14
CHAPITRE I. L'ETAT DE L'ART	16
I. L'INTRODUCTION	17
II. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	17
III. LES GLIOMES.....	18
A. LA CLASSIFICATION OMS 2016.....	18
B. LES ALTERATIONS MOLECULAIRES D'INTERET PRONOSTIQUE.....	20
B.1. Les mutations IDH.....	20
B.2. La codélétion 1p19q.....	21
B.3. Les autres marqueurs moléculaires	21
B.3.a. L'amplification d'EGFR	21
B.3.b. La mutation TP53	21
B.3.c. La mutation d'ATRX	21
B.3.d. La mutation de TERT	22
B.3.e. La méthylation du promoteur de MGMT.....	22
B.3.f. La mutation PTEN.....	22
B.3.g. La mutation H3K27M.....	22
IV. LES GLIOMES DE HAUTS GRADES	22
A. L'EPIDEMIOLOGIE	23
B. L'ETIOLOGIE	23
C. LES CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES.....	24
D. LES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES	24
D.1. La gliomagenèse.....	24
D.2. Les GBM primaires	24
D.3. Les GBM secondaires.....	25
D.4. Les altérations des voies de signalisation cellulaire.....	25
D.4.a. La voie EGFR/ PI3K/PTEN/AKT	26
D.4.b. La voie p16 ^{INK4A} /RB1/CDK4	26
D.4.c. La voie p53/MDM2/p14 ^{ARF}	26
D.4.d. La mutation IDH1 ^{R132H}	27
E. LE DIAGNOSTIC.....	28
E.1. L'anatomopathologie	28
F. LE PRONOSTIC	29
G. LA THERAPEUTIQUE.....	30
G.1. Le protocole Stupp.....	30
G.2. Les thérapies ciblées.....	30
G.3. Les thérapies ciblant IDH1 ^{R132H}	31
G.4. Les autres pistes thérapeutiques.....	31
V. LA CONCLUSION.....	31
CHAPITRE II. L'IMAGERIE MEDICALE.....	33
I. L'INTRODUCTION	34

II. L'IRM.....	34
A. LE PRINCIPE PHYSIQUE	34
B. LES SEQUENCES IRM DITES CONVENTIONNELLES	36
B.1. Le temps d'écho.....	36
B.2. Le temps de répétition.....	36
B.2.a. L'imagerie pondérée T ₁	36
B.2.b. L'imagerie pondérée T ₂	36
C. LES SEQUENCES MULTIPARAMETRIQUES	37
C.1. L'imagerie de diffusion.....	38
C.2. La perfusion	38
C.2.a. La méthode dite à l'équilibre	38
C.2.b. La méthode Dynamic Contrast-Enhanced	39
C.3. La spectroscopie	39
III. LA TEP	41
A. LE PRINCIPE PHYSIQUE	41
A.1. La détection	41
A.2. La quantification.....	42
A.3. Les volumes d'intérêts	42
B. LES ACQUISITIONS MULTIPARAMETRIQUES	43
B.1. Les paramètres statiques	43
B.2. Les paramètres dynamiques	43
C. LES RADIOTRACEURS	43
C.1. Le fluorodéoxyglucose.....	43
C.2. Les analogues aux acides aminés.....	44
C.2.a. Le [¹¹ C]-methyl-L-methionine	45
C.2.b. La 3,4-dihydroxy-6-[¹⁸ F]-fluoro-L-phenylalanine	46
C.2.c. La O-(2-[¹⁸ F]-fluoroethyl)-L-tyrosine	46
C.3. Les nouveaux radiotraceurs	47
C.3.a. L'angiogénèse	47
C.3.b. La neuro-inflammation	48
IV. LA RADIOMIQUE	49
V. LA CONCLUSION.....	50
CHAPITRE III. LE MODELE PRECLINIQUE	52
I. L'INTRODUCTION	53
II. LE MODELE DE LA LIGNEE CELLULAIRE	53
A. LA METHODE DU CRISPR/CAS9.....	53
B. LA LIGNEE U87-MG.....	54
III. LE MODELE ANIMAL	55
A. LE RAT	55
B. LA GREFFE ORTHOTOPIQUE	55
IV. LA CONCLUSION	56
CHAPITRE IV. LA CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> DE LIGNEES CELLULAIRES DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}	58
I. L'INTRODUCTION	59
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	59
A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-	59
B. LA VALIDATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H}	59
B.1. Le western blot.....	59
B.2. Le dosage du 2-HG	60
C. LES RADIOTRACEURS	60
C.1. La production clinique	60
C.2. La production R&D	60
C.2.a. La [¹⁸ F]FET.....	60
C.2.b. La [¹¹ C]MET.....	60
C.2.c. Le [⁶⁸ Ga]NODAGA-(RGDyK) ₂	61
C.2.d. Le [¹⁸ F]DPA-714	61
D. L'ETUDE DE LA CINETIQUE DES RADIOPHARMACEUTIQUES <i>IN VITRO</i>	61
E. L'ANALYSE STATISTIQUE	61

III. LES RESULTATS	62
A. LA CARACTERISATION TUMORALE EN <i>IN VITRO</i>	62
A.1. La confirmation de l'expression et de l'activité de la mutation IDH1 ^{R132H} dans la lignée mutante	62
A.2. L'analyse des cinétiques de captation des radiotraceurs dans les lignées tumorales	62
IV. LA CONCLUSION	63
CHAPITRE V. LA CARACTERISATION <i>IN VIVO</i> PAR IRM MULTIPARAMETRIQUE ET PAR SRM DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}	65
I. L'INTRODUCTION	66
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	66
A. LA CULTURE DES LIGNEES	66
B. LE MODELE ANIMAL	66
C. L'IRM	66
C.1. La procédure expérimentale	66
C.2. Les séquences IRM	67
C.2.a. La carte anatomique pondérée en T ₂	67
C.2.b. La carte du coefficient de diffusion apparent	67
C.2.c. La carte T ₁	68
C.2.d. La carte du flux sanguin cérébral	68
C.2.e. La carte T ₂	68
C.2.f. La carte de l'oxygénation	68
C.2.g. La carte du volume sanguin et de l'angiogenèse	68
C.2.h. La carte de la perméabilité vasculaire	69
D. LE TRAITEMENT DES IMAGES	69
D.1. Le calcul des cartes paramétriques	69
D.1.a. L'imagerie anatomique pondérée en T ₂	69
D.1.b. Le paramètre du coefficient de diffusion apparent	70
D.1.c. Le paramètre de la carte T ₁	70
D.1.d. Le paramètre du flux sanguin cérébral	70
D.1.e. Le paramètre du volume sanguin et les paramètres de l'angiogenèse	71
D.1.f. Les paramètres de l'oxygénation	71
D.1.g. Les paramètres de la perméabilité vasculaire	72
E. LA SPECTROSCOPIE	72
E.1. La séquence d'acquisition	72
E.2. La quantification des métabolites	72
F. L'ANALYSE STATISTIQUE	73
III. LES RESULTATS	73
A. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR IRM	73
B. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LES ZONES PERIPHERIQUES TUMORALES	77
C. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LE TISSU CEREBRAL SAIN	77
D. LES CARACTERISTIQUES DISCRIMINANTES DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} PAR IRM	77
D.1. L'analyse discriminante linéaire	77
D.2. Le clustering	78
E. LA CARACTERISATION DU PROFIL METABOLIQUE TUMORALE PAR SRM	80
IV. LA CONCLUSION	81
CHAPITRE VI. LA CARACTERISATION <i>IN VIVO</i> EN TEP MULTITRACEURS DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}	82
I. L'INTRODUCTION	83
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	83
A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-	83
B. LE MODELE ANIMAL	83
C. LES RADIOTRACEURS	84
D. LA TEP	84
D.1. La procédure expérimentale	84
D.2. Le traitement des images	85
E. L'IRM	86
E.1. L'acquisition et le traitement des images	86
F. LES ANALYSES STATISTIQUES	87
III. LES RESULTATS	87

A. LA POPULATION DE RATS	87
B. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR TEP	88
B.1. L'analyse univariée	88
B.1.a. Le volume tumoral	88
B.1.b. Les paramètres statiques	89
B.1.c. Les paramètres dynamiques	91
B.2. L'analyse multivariée	92
C. LE COEFFICIENT DSC	93
IV. LA CONCLUSION	94
CHAPITRE VII. LA CARACTERISATION EX VIVO EN HR-MAS ET EN HISTOLOGIE DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}	95
I. L'INTRODUCTION	96
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	96
A. LA HR-MAS	96
A.1. L'acquisition	96
A.2. Le traitement des spectres HR-MAS	96
B. L'HISTOLOGIE	97
B.1. Les marquages	97
B.2. Le traitement des images	97
C. L'ANALYSE STATISTIQUE	97
III. LES RESULTATS	98
A. LA CARACTERISATION TUMORALE EN HR-MAS	98
B. LA CARACTERISATION TUMORALE EN IMMUNO-HISTOPATHOLOGIE	99
B.1. L'expression de la mutation IDH1 ^{R132H}	99
B.2. La prolifération	100
B.3. L'angiogenèse	100
B.4. Les récepteurs et les transporteurs	101
IV. LA CONCLUSION	102
CHAPITRE VIII. LA DISCUSSION	104
I. LA CARACTERISATION TUMORALE	105
A. IN VITRO	105
B. L'IMAGERIE <i>IN VIVO</i>	105
B.1. Par IRM	105
B.2. Par TEP	107
C. EX VIVO	108
II. LES LIMITATIONS	109
CHAPITRE IX. LA SYNTHÈSE ET LES PERSPECTIVES	110
I. LA CONCLUSION GÉNÉRALE	111
II. LES PERSPECTIVES	111
LES RÉFÉRENCES	113
LES ANNEXES	128

LA LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. GRADE DE MALIGNITE DES GLIOMES INFILTRANTS [1].....	18
TABLEAU 2. CRITERES RANO DANS L'EVALUATION RADIOLOGIQUE DE LA REPOSE AUX TRAITEMENTS DES GLIOMES [4].	37
TABLEAU 3. ANALYSE QUANTITATIVE UNIVARIEE DES PARAMETRES IRM POUR LES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-, LES ZONES TUMORALES PERIPHERIQUES ET LE TISSU CEREBRAL SAIN CONTROLATERAL. UN TEST DE KRUSKAL-WALLIS AVEC $P<0,05$ A ETE REALISE POUR LES COMPARAISONS ENTRE LES DEUX TYPES DE TUMEUR (*), LA PERIPHERIE DES TUMEURS (†), LES TUMEURS IDH1+ VERSUS LE TISSU CEREBRAL SAIN CONTROLATERAL (#) ET LES TUMEURS IDH1- VERSUS LE TISSU CEREBRAL SAIN CONTROLATERAL (*).	74
TABLEAU 4. REPARTITION DES CLUSTERS POUR LA DENSITE VASCULAIRE ET LE TTP, EXPRIMEE EN MOYENNES $\pm$ ET.	78
TABLEAU 5. CONCENTRATIONS ET VARIATIONS DES METABOLITES INDUIT PAR L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS PAR SRM IN VIVO. EN GRAS, UN TEST DE MANN-WHITNEY AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A $P<0,05$	80
TABLEAU 6. RECAPITULATIF DES IMAGES DE TUMEURS DISPONIBLES POUR CHAQUE RADIOTRACEUR EN ACQUISITIONS STATIQUES ET DYNAMIQUES.	88
TABLEAU 7. RESULTATS DE L'ANALYSE UNIVARIEE POUR LES DONNEES D'IRM ET DE LA TEP. EN GRAS, UN TEST DE MANN WHITNEY AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A $<0,05$	90
TABLEAU 8. RESULTATS DE L'ANALYSE MULTIVARIEE POUR L'IRM ET LA TEP, APRES SELECTION DES PARAMETRES DE L'ANALYSE UNIVARIEE PRESENTANT UNE VALEUR $P<0,2$. EN GRAS, UNE REGRESSION LOGISTIQUE MULTIVARIEE AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A $P<0,05$	92
TABLEAU 9. RESULTATS DU COEFFICIENT DE SIMILARITE DSC ENTRE LES MTV DES DIFFERENTS RADIOTRACEURS TEP. SEULS LES GROUPES AVEC UN $N>5$ ONT ETE COMPARE.....	94
TABLEAU 10. CONCENTRATIONS ET VARIATIONS DES METABOLITES INDUIT PAR L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS EN HR-MAS EX VIVO. EN GRAS, UN TEST DE MANN-WHITNEY AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A $P<0,05$	98
TABLEAU 11. CONCENTRATIONS ET VARIATIONS DES METABOLITES INDUIT PAR L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS EN SRM ET HR-MAS. EN GRAS, UN TEST DE MANN-WHITNEY AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A $P<0,05$	129

LA LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SNC [5].	17
FIGURE 2. ORGANIGRAMME SIMPLIFIE DE LA CLASSIFICATION DES GLIOMES DIFFUS [1].	19
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MUTATIONS IDH DANS UNE CELLULE [9].	20
FIGURE 4. DISTRIBUTION DES TUMEURS PRIMITIVES DU SNC D'APRES LE RAPPORT STATISTIQUE DU CBTRUS 2012-2016 [15].	23
FIGURE 5. PROFIL MOLECULAIRE DES VOIES DE LA GLIOMAGENESE [18].	24
FIGURE 6. PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE ALTEREES DANS LA GLIOMAGENESE [14].	25
FIGURE 7. IMAGES HISTOLOGIQUES A] D'UN FOYER NECROTIQUE ET B] DE LA PROLIFERATION ENDOTHELIO-CAPILLAIRE PAR HES, ET DE MARQUAGES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES C] D'OLIG2, D] DE GFAP, E] DE KI-67 ET F] DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS UN GBM.	29
FIGURE 8. PROTOCOLE <i>STUPP</i> DANS LE TRAITEMENT DES GBM [36].	30
FIGURE 9. ALIGNEMENT DES SPINS EN PRESENCE D'UN CHAMP MAGNETIQUE B ₀ [50].	35
FIGURE 10. EXEMPLE DE L'EMISSION D'UNE ONDE RF B1 EMISE A LA FREQUENCE DE LARMOR M ₀ , AVEC LE BASCULEMENT DE L'AIMANTATION VERS UN PLAN TRANSVERSE D'UN ANGLE Ψ [50].	35
FIGURE 11. SEQUENCES CONVENTIONNELLES EN IRM DANS L'IMAGERIE D'UN GBM [50].	37
FIGURE 12. EXEMPLE DE SPECTRE SRM DANS A] DU TISSU CEREBRAL SAIN ET B] UN GBM [58].	40
FIGURE 13. REACTION D'ANNIHILATION DE DEUX PHOTONS γ [58].	41
FIGURE 14. CAPTATION DU [¹⁸ F]-FDG PAR UN RECEPTEUR GLUT-1 TRANSMEMBRANAIRE [60].	44
FIGURE 15. STRUCTURES RADIOCHIMIQUES A] DE LA [¹⁸ F]FDOPA, B] DE LA [¹⁸ F]-FET ET C] DE LA [¹¹ C]MET.	44
FIGURE 16. IMAGERIE TEP D'UN GBM AU [¹¹ C]MET AVEC A] L'IRM T ₂ -FLAIR, B] LE CONTRASTE T ₁ -GADOLINIUM ET C] LA FIXATION AU [¹¹ C]MET [65].	45
FIGURE 17. IMAGERIE TEP D'UN GBM A LA [¹⁸ F]FDOPA AVEC A] L'IRM T ₂ -FLAIR ET B] LA FIXATION A LA [¹⁸ F]FDOPA [68].	46
FIGURE 18. IMAGERIE TEP D'UN GBM A LA [¹⁸ F]FET AVEC A] L'IRM T ₂ -FLAIR ET B] LA FIXATION A LA [¹⁸ F]FET [71].	47
FIGURE 19. STRUCTURE RADIOCHIMIQUE DU [⁶⁸ GA]NODAGA-(RGDYK) ₂ .	48
FIGURE 20. STRUCTURE RADIOCHIMIQUE DU [¹⁸ F]-DPA-714.	49
FIGURE 21. REPRESENTATION DE LA PLACE DE L'IMAGERIE MEDICALE DANS LA RADIOMIQUE [90].	50
FIGURE 22. PRINCIPE DU MECANISME DU SYSTEME CRISPR/CAS9 [83].	54
FIGURE 23. ORGANIGRAMME DU PLAN EXPERIMENTAL DE NOTRE ETUDE.	57
FIGURE 24. A] EXPRESSION DE LA PROTEINE DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} PAR WESTERN BLOT DANS LA LIGNEE CELLULAIRE IDH1+. B] CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN 2-HG (MM) MESUREE PAR L'ABSORBANCE SPECTROPHOTOMETRIQUE POUR LES LIGNEES CELLULAIRES IDH1+ ET IDH1-.	62
FIGURE 25. HISTOGRAMMES DES ANALYSES MULTITRACEURS IN VITRO DANS LES LIGNEES CELLULAIRES IDH1+ ET IDH1- A 30, 60 ET 120 MINUTES APRES INCUBATION DES RADIOTRACEURS EXCEPTE LE [¹¹ C]MET POUR LEQUEL LES TEMPS D'INCUBATION ONT ETE REDUITS A 10, 20 ET 30 MINUTES.	63
FIGURE 26. ORGANIGRAMME DU PLAN EXPERIMENTAL EN IRM.	67

FIGURE 27. CARTES REPRESENTATIVES DES PARAMETRES IRM POUR LES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. SUR LA CARTE T ₂ -W, LE CERCLE ROUGE INDIQUE LA ROI DE LA TUMEUR, LE CERCLE BLANC INDIQUE LA ROI DU TISSU SAIN ET LE CERCLE NOIR DELIMITE LA ROI DE LA ZONE PERIPHERIQUE DE LA TUMEUR.	75
FIGURE 28. COURBES D'INTENSITE DU SIGNAL PAR L'ACQUISITION DE LA SEQUENCE DCE DE LA TUMEUR IDH1+ (LIGNE NOIR) ET DE SA PERIPHERIE (RONDS NOIRS), DE LA TUMEUR IDH1- (LIGNE GRISE) ET DE SA PERIPHERIE (RONDS GRIS) ET DU TISSU SAIN (LIGNE GRIS CLAIR). LES VALEURS ONT ETE EXPRIMEES EN MOYENNES $\pm$ ET POUR CHACUN DES GROUPES EXCEPTES CELUI DU TISSU SAIN OU LES VALEURS ONT ETE RASSEMBLEES.	76
FIGURE 29. TEST LDA REPRESENTANT LA SEPARATION DES TUMEURS IDH1+ ET IDH1- SELON LES DEUX PARAMETRES IRM DE LA DENSITE VASCULAIRE ET DU TTP.	78
FIGURE 30. AIRES DE DISTRIBUTION DES CLUSTERS POUR LA DENSITE VASCULAIRE ET LE TTP DES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. LES BARRES REPRESENTENT LES PROPORTIONS DE CHACUN DES CLUSTERS EXPRIMES EN POURCENTAGE AU SEIN DE LA ROI. LA QUANTIFICATION DE CES CLUSTERS EST DONNEE DANS LE TABLEAU 4.	79
FIGURE 31. REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION DE LA DENSITE VASCULAIRE ET DU TTP DANS CHACUN DES 5 CLUSTERS.	79
FIGURE 32. REPRESENTATION DES SPECTRES RMN DES CHANGEMENTS METABOLIQUES INDUIT PAR L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS EN SRM. LEGENDE : 1- ACIDE GAMMA-AMINOBUTYRIQUE, 2- N-ACETYLASPARTATE, 3- GLUTAMATE, 4- GLUTAMINE, 5- GLUTATHION, 6- CREATINE+PHOSPHOCREATINE, CHOLINE TOTALE [7- CHOLINE, 8- PHOSPHOCHOLINE, 9- GLYCEROPHOSPHOCHOLINE], 10- TAURINE, 11- MYO-INOSITOL.	81
FIGURE 33. ORGANIGRAMME DU PLAN EXPERIMENTAL EN IMAGERIE TEP.	84
FIGURE 34. IMAGES AXIALES REPRESENTATIVES DE L'IMAGERIE TEP STATIQUE FUSIONNEES AVEC L'IRM T ₂ -W POUR LES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. L'IRM EST EXPRIMEE EN INTENSITE DU SIGNAL ET LA TEP EN SUV.	89
FIGURE 35. COURBES ACTIVITE-TEMPS REPRESENTANT L'EVOLUTION DE LA MOYENNE $\pm$ ET DU SUVPEAK DES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. UN TEST DE MANN WHITNEY A ETE REALISE AVEC UNE SIGNIFICATIVITE A P<0,05.	91
FIGURE 36. REPRESENTATION ROC DE LA COMBINAISON DU TBRMAX ET DE LA PENTE DU [⁶⁸ GA]NODAGA-(RGDYK) ₂ ET DE LA PENTE DU [¹⁸ F]DPA-714 POUR DISCRIMINER LES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-.	93
FIGURE 37. REPRESENTATION DES SPECTRES RMN DES CHANGEMENTS METABOLIQUES INDUIT PAR L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS EN HR-MAS. LEGENDE : 1- ACIDE GAMMA-AMINOBUTYRIQUE, 2- N-ACETYLASPARTATE, 3- GLUTAMATE, 4- GLUTAMINE, 5- GLUTATHION, 6- CREATINE+PHOSPHOCREATINE, CHOLINE TOTALE [7- CHOLINE, 8- PHOSPHOCHOLINE, 9- GLYCEROPHOSPHOCHOLINE], 10- TAURINE, 11- MYO-INOSITOL.	99
FIGURE 38. COUPES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES DU MARQUAGE DE L'EXPRESSION DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} DANS LES TUMEURS IDH1+ ET IDH1- AVEC UN ANTICORPS ANTI-IDH1 ^{R132H} . GROSSISSEMENTS X40.	100
FIGURE 39. COUPES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES DU MARQUAGE DE LA PROLIFERATION KI-67 DES TUMEURS IDH1+, IDH1- ET DU TISSU CEREBRAL SAIN. GROSSISSEMENT X40.	100
FIGURE 40. COUPES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES DU MARQUAGE CD-31 DES TUMEURS IDH1+, IDH1- ET DU TISSU CEREBRAL SAIN. GROSSISSEMENT X40.	101
FIGURE 41. COUPES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES DU MARQUAGE AVB3 DES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. GROSSISSEMENT X40.	101
FIGURE 42. COUPES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES DES RECEPTEURS GLUT-1 ET TSPO ET DU TRANSPORTEUR LAT-1 DES TUMEURS IDH1+ ET IDH1-. GROSSISSEMENT X20.	102

LA LISTE DES ABBREVIATIONS

ACE Acétate	DMEME <i>Dulbecco modified eagle's minimal essential</i>
ADC <i>Apparent diffusion coefficient</i>	DSC Coefficient de similarité
ADN Acide désoxyribonucléique	DSC <i>Dynamic susceptibility contrast</i>
ALA Alanine	EGFR <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ARN Acide ribonucléique	EI Efficacité d'inversion
ASC Ascorbate	EPI <i>Echo Planar Imaging</i>
ASL <i>Labelling spin arterial</i>	FAIR <i>Flow-sensitive alternating inversion recovery</i>
ASP Aspartate	FBS <i>Fetal bovin serum</i>
ATCC <i>American Type Culture Collection</i>	FLAIR <i>Fluid Attenuation Inversion Recovery</i>
ATRX <i>Alpha-Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	FOV <i>Field of view</i>
AUC <i>Area under the curve</i>	GABA Acide- γ -aminobutyrique
BHE Barrière hémato-encéphalique	GBM Glioblastome
BVf <i>Blood volume fraction</i>	GEFC <i>Gradient echo with flow compensation</i>
CBf <i>Cerebral blood flow</i>	GFAP <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
CHO Choline	GHG Gliome de haut grade
CMRO₂ <i>Cerebral metabolic rate of oxygen</i>	GLN Glutamine
CPMG <i>Carr–purcell–meiboom–gill</i>	GLU Glutamate
Cr Créatine	GLY Glycine
CRISPR/Cas9 <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase9</i>	GPC <i>Glycérophosphocholine</i>
CRLB Bornes Cramer Rao	GSH Glutathion
CTK Cytokines	HBSS <i>Hank's balanced salt solution</i>
D₂O <i>Deuterium oxide</i>	HIF-1α <i>Hypoxia inducible factor-1α</i>
DAB Diaminobenzidine	HR-MAS <i>High resolution magic angle spinning spectroscopy</i>
DCE <i>Dynamic Contrast-Enhanced</i>	

HRP Horseradish peroxidase	NADP Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
HYPO Hypotaurine	<i>NMR Nuclear magnetic resonance</i>
IA Intelligence artificielle	<i>Olig2 Oligodendrocyte transcription factor</i>
IDH1 Isocitrate déshydrogénase 1	OMS Organisation mondiale de la santé
IFN-γ Interférons- γ	<i>pCASL Pseudo-Continuous Arterial Spin Labeling</i>
IHC Immunohistochimie	PCHO Phosphocholine
ILK Interleukines	PCR Phosphocréatine
IRM Imagerie par résonance magnétique	<i>PDT Photodynamic therapy</i>
LAC Lactate	<i>PDX Patient-derived xenograft</i>
<i>LAT L-type amino acid transporter</i>	PE Phosphoéthanolamine
LCR Liquide céphalo-rachidien	PFA Paraformaldéhyde
<i>LDA Linear discriminant analysis</i>	p-g Post-greffe
LOR Line of response	PHD Prolyl-hydroxylase
<i>MDM2 Murine Double Minute 2</i>	p-i Post-injection
<i>MGE Multiple gradient echo</i>	PI3K Phospho-Inositide-3-Kinase
<i>MGESFIDSE Multiple gradient echo sampling of the free induction decay and spin echo</i>	PIP2 Phosphatidyl-Inositol-4,5-biPhosphate
MGMT Methylguanine-DNA methyl transferase	<i>PRESS Point resolved spectroscopy</i>
M-INS Myo-inositol	<i>PTEN Phosphatase and tensin homolog</i>
<i>MP³ Medical software for processing multi-parametric images pipelines</i>	<i>qBOLD Quantitative blood oxygen level dependent</i>
<i>MSE Multiple spin-echo</i>	<i>QUEST Quantum estimation</i>
<i>MTI Micro-vessel type index</i>	<i>RANO Response Assessment in Neuro-Oncology</i>
<i>MTI Multi-inversion time</i>	RARE Rapid acquisition with refocused echoes
<i>mTOR Mammalian Target Of Rapamycin</i>	RB1 Rétinoblastome 1
<i>MTV Metabolic tumor volume</i>	
NAA N-acétylaspartate	

RCC Coefficients de recouvrement de contraste	USPIO <i>Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
RF Radiofréquence	VAL Valine
ROC Courbe récepteur-opérateur	VOI <i>Volume of interest</i>
ROI Région d'intérêt	VSI <i>Vessel size index</i>
ROS Espèces réactives oxygénés	α-CG α -Cétoglutarate
RTK Récepteur tyrosine kinase	β-OH β -Hydroxybutyrate
SDS Sodium dodecylsulfate	2-HG 2-Hydroxyglutarate
SER Serine	
SNC Système nerveux central	
SRM Spectroscopie par résonance magnétique	
StO₂ <i>Tissular saturation of oxygen</i>	
SUC Succinate	
SUV <i>Standard Uptake Value</i>	
TAC Courbes activité-temps	
TAU Taurine	
TBR <i>Tumor-to-Brain Ratio</i>	
tCHO Choline totale	
TDM Tomodensitométrie	
TE Temps d'écho	
TEP Tomographie par émission de positon	
TERT <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>	
TET <i>Ten-Eleven Translocation</i>	
TNF-α <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>	
TR Temps de répétition	
TTF <i>Tumor Treating Fields</i>	
TTP <i>Time-to-peak</i>	

LA LISTE DES TRAVAUX ISSUS DE LA THESE

Les publications dans des revues

A. Clément, T. Zaragori, R. Filosa, O. Ovdiichuk, M. Beaumont, C. Collet, E. Roeder, F. Maskali, M. Barberi-Heyob, C. Pouget, M. Doyen, A. Verger. **Multitracer PET imaging of the IDH mutation in glioma: a translational in vitro and in vivo characterization.** *Soumis dans le journal MIB.*

A. Clément, M. Doyen, F. Fauvelle, G. Hossu, B. Chen, M. Barberi-Heyob, A. Hirtz, Z. Lamiral, C. Pouget, G. Gauchotte, G. Karcher, M. Beaumont, A. Verger, B. Lemasson. **In vivo characterization by multiparametric magnetic resonance imaging and spectroscopy of physiological and metabolic changes related to the isocitrate dehydrogenase 1-mutation expression on a rat model with derived human glioblastoma cell lines orthotopically grafted.** *En révision dans le journal NMR in Biomedicine.*

Les présentations dans les congrès

A. Clément, M. Doyen, B. Lemasson, R. Filosa, M. Beaumont, M. Bailing, J. Felblinger, G. Karcher, A. Verger. **Le [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGD)₂ est-il le radiotracer de choix pour la caractérisation en imagerie TEP de la mutation IDH1^{R132H} dans les glioblastomes ?** 5^{ème} Journées Francophones de Médecine Nucléaire, Paris. Le 29 Mars 2019.

A. Clément, T. Zaragori, M. Doyen, R. Filosa, O. Ovdiichuk, G. Hossu, C. Collet, F. Maskali, J. Pierson, E. Roeder, G. Karcher, A. Verger. **Multitracer PET imaging for characterization of the IDH mutation in glioma: a translational in vitro and in vivo study.** *Congrès virtuel de l'European Association of Nuclear Medicine 2020. Le 25 Octobre 2020.*

Les communications orales

A. Clément, A. Verger. **Etude pilote de la caractérisation de la mutation IDH1^{R132H} par imagerie TEP multitraceur dans un modèle préclinique.** Réseau IT-Neuro de Lorraine. Le 10 Juin 2017.

A. Clément, M. Doyen, B. Lemasson, E. Barbier, R. Filosa, C. Collet, F. Maskali, M. Beaumont, M. Bailing, C. Pouget, J. Felblinger, G. Karcher, A. Verger. **Le [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGD)₂ : un radiotracer TEP pour la caractérisation non invasive de la mutation IDH1^{R132H} dans les glioblastomes? Une étude pilote multi-traceurs TEP et IRM multimodale in vitro et in vivo.** Réseau IT-Neuro de Lorraine. Le 06 Juillet 2019.

A. Clément, A. Verger. **La caractérisation par imagerie multimodale de lignées cellulaires dérivant d'un glioblastome humain en in vitro et en in vivo après une greffe orthotopique chez le rat : étude de l'effet de l'expression de la mutation IDH1^{R132H}.** 5^{ème} Journée d'Echanges sur la Recherche en Cancérologie en Lorraine. Le 21 Janvier 2019.

Ma Thèse en 180 secondes. Université de Lorraine. Le 17 Janvier 2019.

LE PREAMBULE

L'intégration récente de la mutation isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) dans la classification des gliomes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2016, a une réelle importance diagnostique [1]. Son expression dans les gliomes de haut grade (GHG) est associée à une meilleure réponse au traitement par chimio-radiothérapie avec une amélioration du taux de survie des patients [2, 3] lui conférant une valeur pronostique également d'un intérêt majeur.

Ces observations cliniques de bon pronostic sont le résultat d'un changement global dans le métabolisme tumoral impactant indirectement différentes voies de la gliomagenèse. Cependant l'ensemble des effets physiopathologiques induit par cette mutation restent largement inconnus. Actuellement l'unique moyen de détecter la présence de la mutation IDH1 repose sur des analyses anatomopathologiques et/ou moléculaires nécessitant un acte invasif par biopsie ou par résection chirurgicale du gliome. Dans ce contexte, la possibilité de mettre en évidence la mutation IDH1 exprimée dans les gliomes par de l'imagerie non invasive représente un enjeu grandissant. En ce sens, des nouvelles techniques d'imagerie multimodale ont émergé ces dernières années et bien que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) reste l'examen de référence, la tomographie par émission de positon (TEP) offre une imagerie métabolique tumorale complémentaire intéressante. Cette stratégie d'imagerie multimodale TEP/IRM a été récemment recommandée par le groupe de travail *Response Assessment in Neuro-Oncology* (RANO) dans la prise en charge diagnostique des gliomes [4].

Nous avons pour objectif de caractériser de manière non invasive par imagerie multimodale la mutation IDH1^{R132H} exprimée dans une lignée cellulaire dérivant d'un glioblastome humain (U87-MG) greffée par stéréotaxie dans un modèle de rat. Dans notre projet, la combinaison de l'étude en IRM associée à la TEP se profile comme étant une technique particulièrement prometteuse. En effet, l'originalité de cette étude réside dans une approche IRM multiparamétrique et TEP multitraceurs pour une caractérisation précise des changements physiopathologiques et métaboliques induits par cette mutation.

Le protocole IRM apportera des informations à la fois anatomiques avec la mesure du volume de la tumeur (T₂-w) mais également des informations fonctionnelles en particulier sur la diffusion, la perfusion et la perméabilité vasculaire tumorale. Pour une caractérisation complète de nos tumeurs, nous avons ajouté une acquisition de spectroscopie par résonance magnétique (SRM) pour mettre en évidence les profils des métabolites impactés par la mutation IDH1^{R132H}.

En complément de l'IRM, la TEP fera état du métabolisme glucidique tumoral avec l'utilisation du [^{18}F]FDG, du métabolisme des acides aminés ([^{18}F]FDopa, la [^{11}C]MET et la [^{18}F]FET), de l'angiogenèse avec l'évaluation du [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et de l'inflammation tumorale avec le [^{18}F]DPA-714.

Dans notre démarche, l'étude de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} induite dans une lignée cellulaire de gliome humain s'est imposée comme l'unique moyen de mettre directement en évidence les réelles caractéristiques induites par cette mutation, indépendamment de l'effet des autres mutations et des critères propres aux tumeurs retrouvées chez les patients. En 2017, la banque cellulaire *American Type Culture Collection*® (ATCC) commercialise la lignée U87-MG exprimant la mutation IDH1^{R132H} (IDH1+) par la méthode génétique du *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase9* (CRISPR/Cas9). La deuxième originalité du projet est l'utilisation de cette nouvelle lignée exprimant de manière « basale » et isolée la mutation IDH1^{R132H}, jamais encore étudiée. Un autre avantage est la disponibilité de sa lignée isogénique contrôle U87-MG non mutante pour IDH1 (IDH1-), connue et parfaitement caractérisée. Enfin cette lignée présente également des caractéristiques tumorales humaines dérivant d'un gliome de haut grade et offre une croissance rapide de la tumeur représentant un avantage certain dans notre modèle préclinique.

L'ensemble de ces conditions ont permis le déroulement du projet en 3 étapes principales :

I. L'ETAPE IN VITRO

Après une mise en culture des cellules U87-MG IDH1+ et IDH1-, nous avons reconfirmé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} par Western Blot et de son activité par un dosage du 2-hydroxyglutarate (2-HG) intracellulaire.

Nous avons ensuite quantifié et évalué la cinétique de captation intracellulaire des 6 radiotraceurs TEP d'intérêt avec le [^{18}F]FDG, la [^{18}F]FDopa, la [^{11}C]MET, la [^{18}F]FET, le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂, et le [^{18}F]DPA-714 pour les deux lignées IDH1+ et IDH1-.

II. L'ETAPE IN VIVO

Des greffes orthotopiques des deux lignées IDH1+ et IDH1- chez le rat (*nude*) ont été réalisées. Ensuite cette analyse *in vivo* s'est déroulée en 2 temps chronologiquement différents sur deux groupes de rats différents.

Dans un premier temps, nous avons appliqué le protocole d'IRM multiparamétrique (4,7T) incluant la mesure des volumes tumoraux (T_2 -w), *Apparent Diffusion Coefficient* (ADC), de la perfusion (*Blood Volume* (BVf), *Cerebral Blood Flow* (CBF), la densité vasculaire, *Vessel Size Index* (VSI), *Cerebral Metabolic Rate of Oxygen* (CMRO₂), et *Tissular Saturation of Oxygen* (StO₂) et les paramètres de la perméabilité vasculaire (*Time-To-Peak* (TTP), la valeur maximale du signal, *Area Under the Curve* (AUC) et le pourcentage de réhaussement du contraste). Avec une autre cohorte de rat que celle du protocole IRM, nous avons enregistré les imageries TEP multitraceurs avec les 6 radiotraceurs TEP incluant des reconstructions statiques évaluant les captations *tumor-to-brain ratio* (TBR) moyenne et maximale (TBR_{mean} et TBR_{max}) et des reconstructions dynamiques déterminant le paramètre du TTP et de la pente.

III. L'ETAPE EX VIVO

Après la mise à mort des animaux, nous avons récupéré les échantillons des tumeurs greffées IDH1+ et IDH1-.

Une partie des échantillons issue de la première cohorte de rats (IRM) a été utilisée pour la quantification des spectres des métabolites par HR-MAS (7T) et des analyses immuno-histochimiques de la prolifération cellulaire par le Ki-67, de la vascularisation par le marquage de CD-31 et de la mutation IDH1^{R132H}.

Une autre partie des échantillons issus de la deuxième cohorte de rats (TEP) a servi pour d'autres analyses immuno-histochimiques des récepteurs GLUT-1 et TSPO, des transporteurs LAT-1 et des intégrines $\alpha v \beta 3$.

A noter que l'ensemble de nos travaux ont pu être réalisés grâce aux étroites collaborations extérieures avec notamment le laboratoire de recherche IADI (INSERM U1254) et l'équipe du CIC-IT (CHRU-Nancy, 1433) dirigés par le Pr Jacques FELBLINGER et la coordinatrice déléguée, le Dr Marine BEAUMONT pour l'utilisation de la plateforme IRM 3T, le laboratoire CRAN (UMR7039), en particulier de l'équipe de recherche BIOSIS dirigé par le Pr Muriel BARBERI-HEYOB pour la mise à disposition de l'équipement de culture cellulaire et d'un local de chirurgie petit animal, le laboratoire de recherche IRMAGE de Grenoble (GIN UMR1216) dirigé par le Dr Emmanuel BARBIER, avec l'intervention du Dr Benjamin LEMASSON et du Dr Florence FAUVELLE pour l'utilisation de la plateforme préclinique IRM 4.7T et les analyses de HR-MAS et enfin le département de Biopathologie (CHRU-Nancy) dirigé par le Pr Guillaume GAUCHOTTE avec l'aide précieuse du Dr Celso POUGET pour l'expertise d'anatomopathologie.

De même que le projet n'aurait pas pu aboutir sans l'aide interne de l'ensemble de l'équipe de la plateforme d'imagerie μ TEP petit animal (PRIPA) dirigée par le Dr Fatiha MASKALI et du laboratoire de radiochimie pour la production R&D des radiotraceurs dirigé par le Dr Charlotte COLLET à NANCYCLOTEP.

La présentation du projet sera décrite en 9 chapitres. Le chapitre I résumera l'état de l'art sur les gliomes, incluant une description des effets biologiques connus de la mutation IDH1^{R132H}. Le chapitre II détaillera la place de l'imagerie multimodale dans ce contexte. Le chapitre III décrira le modèle préclinique, le chapitre IV concernera la caractérisation *in vitro* des tumeurs IDH1+ et IDH1-, suivra le chapitre V sur l'application *in vivo* du protocole d'IRM multiparamétrique. Par ailleurs, ce travail a fait l'objet d'un article en révision dans le journal *NMR in Biomedicine*. Le chapitre VI présentera l'utilisation de la TEP multitraceurs dans cette caractérisation tumorale *in vivo*, avec actuellement un article soumis dans le journal *Molecular Imaging and Biology*. Le chapitre VII traitera des expérimentations *ex vivo* avec les profils des métaboliques obtenus en HR-MAS et les analyses immuno-histochimiques. Enfin le chapitre VIII développera la complémentarité des deux techniques d'imagerie et le chapitre IX clôturera le manuscrit avec les perspectives.

Chapitre I.

L'ETAT DE L'ART

I. L'INTRODUCTION	17
II. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	17
III. LES GLIOMES.....	18
A. LA CLASSIFICATION OMS 2016.....	18
B. LES ALTERATIONS MOLECULAIRES D'INTERET PRONOSTIQUE	20
B.1. Les mutations IDH.....	20
B.2. La codélétion 1p19q.....	21
B.3. Les autres marqueurs moléculaires	21
B.3.a. L'amplification d'EGFR	21
B.3.b. La mutation TP53	21
B.3.c. La mutation d'ATRAX	21
B.3.d. La mutation de TERT	22
B.3.e. La méthylation du promoteur de MGMT.....	22
B.3.f. La mutation PTEN.....	22
B.3.g. La mutation H3K27M.....	22
IV. LES GLIOMES DE HAUTS GRADES	22
A. L'EPIDEMIOLOGIE	23
B. L'ETIOLOGIE	23
C. LES CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES.....	24
D. LES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES	24
D.1. La gliomagenèse	24
D.2. Les GBM primaires	24
D.3. Les GBM secondaires.....	25
D.4. Les altérations des voies de signalisation cellulaire	25
D.4.a. La voie EGFR/ PI3K/PTEN/AKT	26
D.4.b. La voie p16 ^{INK4A} /RB1/CDK4	26
D.4.c. La voie p53/MDM2/p14 ^{ARF}	26
D.4.d. La mutation IDH1 ^{R132H}	27
E. LE DIAGNOSTIC.....	28
E.1. L'anatomopathologie	28
F. LE PRONOSTIC	29
G. LA THERAPEUTIQUE.....	30
G.1. Le protocole Stupp.....	30
G.2. Les thérapies ciblées.....	30
G.3. Les thérapies ciblant IDH1 ^{R132H}	31
G.4. Les autres pistes thérapeutiques.....	31
V. LA CONCLUSION.....	31

I. L'INTRODUCTION

Nous parlerons dans ce chapitre des gliomes et particulièrement des GHG. Nous décrirons les voies générales de la gliomagenèse et des mutations apparaissant au cours de ce processus. Et parmi ces mutations nous nous attarderons davantage sur la mutation IDH1^{R132H} et nous détaillerons son rôle et ses effets physiopathologiques et métaboliques connus dans la littérature.

II. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le système nerveux central (SNC) est composé de neurones et de cellules gliales. Les cellules gliales forment un tissu de soutien appelé la névroglie et ont un rôle indispensable à la survie des neurones. Elles participent à la réparation des liaisons synaptiques, la nutrition et la conduction nerveuse. La névroglie se compose de quatre types cellulaires : les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et les cellules microgliales (**Figure 1**).

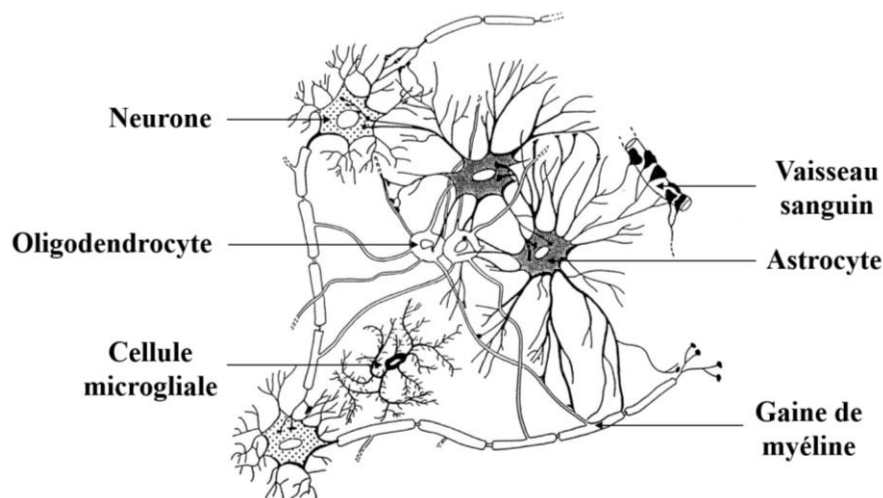


Figure 1. Représentation schématique du SNC [5].

Les astrocytes, en forme d'étoile représentent une interface étroite avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et assurent un rôle de protection par la barrière hémato-encéphalique (BHE), de cicatrisation du tissu nerveux et de nutrition des neurones. Les oligodendrocytes sont responsables de la formation des gaines de myéline autour des prolongements neuronaux et facilitent la conduction nerveuse. Les épendymocytes tapissent l'intérieur des cavités des ventricules contenant le liquide cérébro-rachidien (LCR) et assurent

sa circulation. Les cellules microgliales sont des monocytes quiescents, qui en cas d'agression sont capables de s'activer et de se transformer en macrophages. Elles assurent les fonctions immunitaires.

III. LES GLIOMES

Les gliomes sont l'ensemble des tumeurs cérébrales primitive malignes, issues de la névroglie. Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales peuvent se multiplier et leur prolifération incontrôlée est à l'origine des gliomes.

A. LA CLASSIFICATION OMS 2016

La classification des tumeurs du SNC a été établie par l'organisation mondiale de la santé en 1979 et mise à jour en 2016. Cette classification repose sur le type cellulaire physiologique prédominant dont la tumeur dérive. Elle représente un système de *grading*, une échelle de malignité caractérisée par 5 critères histologique qui sont la densité cellulaire, les atypies nucléaires, les mitoses, la prolifération vasculaire et la nécrose. Ces 5 critères décrivent quatre grades histopronostiques de I à IV (**Tableau 1**).

Tableau 1. Grade de malignité des gliomes infiltrants [1].

Type cellulaire	Grade II	Grade III	Grade IV
Astrocytome	Astrocytome diffus IDH-mutant Astrocytome diffus IDH-non mutant	Astrocytome diffus IDH-mutant Astrocytome diffus IDH-non mutant	Glioblastome IDH-mutant et Glioblastome IDH-non mutant Glioblastome sans autre spécification
Oligo-dendrogliome	Oligo-dendrogliome IDH-mutant avec co-délétion 1p19q	Oligo-dendrogliome IDH-mutant avec co-délétion 1p19q	-
-	-	-	Gliome diffus de la ligne médiane H3K27M-mutant

Les différents grades sont définis comme détaillé ci-après :

Grade II : tumeurs à croissance lente, aux limites imprécises et au caractère infiltrant expliquant les récives fréquentes après résection chirurgicale. Ces tumeurs ont également

tendance à progresser vers un grade de malignité supérieur. Ce grade concentre les gliomes diffus.

Grade III : tumeurs anaplasiques présentant des critères histologiques de malignité avec une évolution rapide comparativement aux grades I et II. La probabilité de transformation en grade IV des tumeurs de phénotype astrocytaire est importante. Ce grade constitue les gliomes anaplasiques.

Grade IV : tumeurs aux critères malins prédominants. Elles peuvent contenir divers types cellulaires au potentiel multiplicatif et présentent un ou plusieurs foyers de nécrose associés ou non à la présence de foyers de prolifération endothélio-capillaire. Ce grade est de mauvais pronostic avec un taux de survie faible quel que soit le traitement. L'unique représentant du grade IV est la classe des glioblastomes (GBM) qu'ils soient primaires dit de *novo* (>90%) [5] ou secondaires provenant de l'évolution d'une tumeur astrocytaire de grade inférieur.

La révision de la classification en 2016 intègre des données moléculaires et génomiques aux analyses histopathologiques [1]. Cette nouvelle édition définit une restructuration plus pertinente et homogène des gliomes avec un ensemble de marqueurs d'intérêt diagnostique et pronostique mieux corrélé à l'évolution clinique [6]. Parmi ces marqueurs, la présence de la mutation du gène IDH (IDH1 ou IDH2) et/ou de la codélétion 1p/19q permet de subdiviser les gliomes en astrocytome diffus IDH mutant avec codélétion 1p/19q et en glioblastome IDH mutant ou non mutant (**Figure 2**).

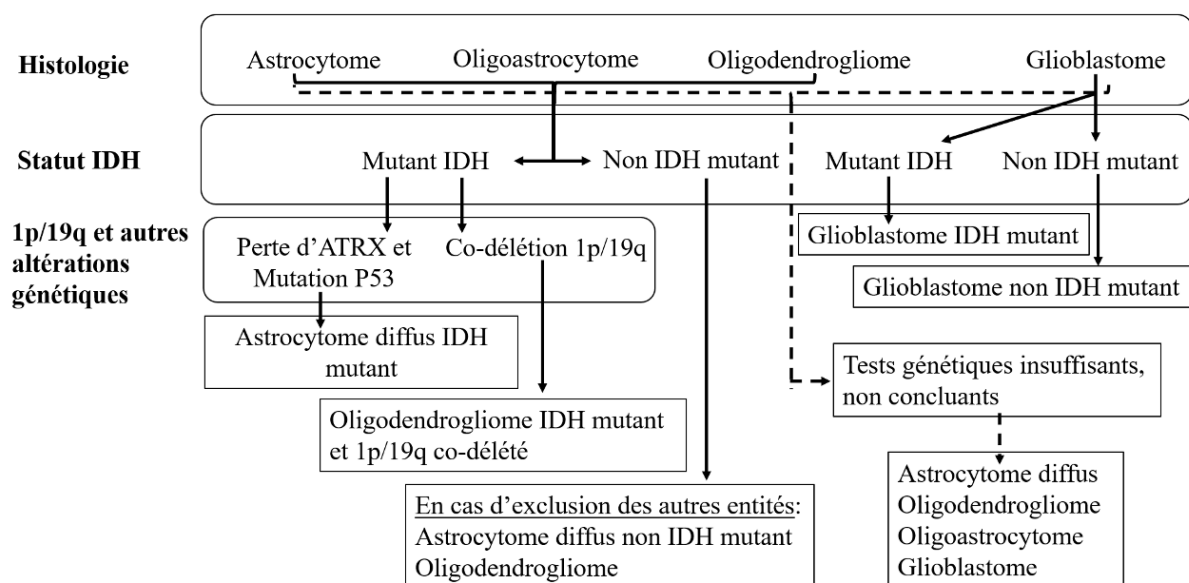


Figure 2. Organigramme simplifié de la classification des gliomes diffus [1].

B. LES ALTERATIONS MOLECULAIRES D'INTERET PRONOSTIQUE

B.1. Les mutations IDH

L'IDH constitue une enzyme métabolique du cycle de Krebs responsable de la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -CG) en réduisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+) en NADPH.

Il existe trois gènes codant pour l'enzyme de l'IDH, IDH1 est localisé dans le cytoplasme cellulaire, l'IDH2 et l'IDH3 qui sont des isoformes de IDH1 se situent dans le cytoplasme de la mitochondrie (**Figure 3**). Bien que les trois IDH aient la même activité dans des régions différentes, seules les mutations IDH1 et IDH2 sont retrouvées dans les gliomes [7]. Cependant l'apparition d'une mutation de l'IDH1, touchant le codon 132 (IDH1^{R132H}) est plus fréquente qu'une mutation de l'IDH2 ciblée sur le codon 172 (IDH1^{R172H}). Celle-ci est également la plus fréquente au sein des gliomes [8].

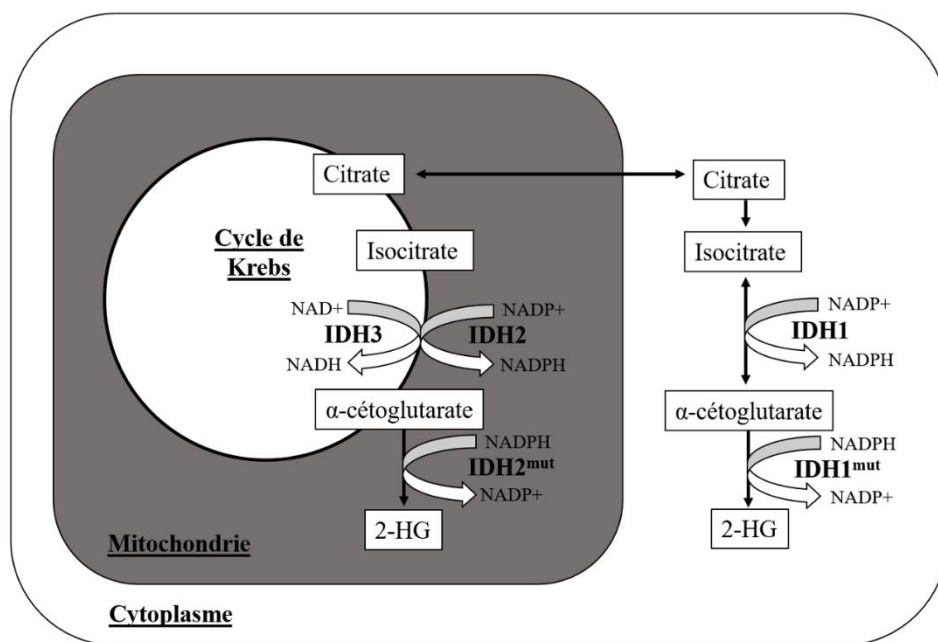


Figure 3. Représentation schématique des mutations IDH dans une cellule [9].

La mutation IDH1^{R132H}, qui représente le remplacement d'une arginine (R) par une histidine (H) sur le site actif de l'enzyme, induit une perte d'affinité enzyme/substrat ne permettant plus de convertir l'isocitrate en α -CG. La conséquence de cette perte fonctionnelle est l'accumulation de 2-hydroxyglurate (2-HG) intracytoplasmique [9]. La modification de

l'activité cette enzyme IDH1 a un effet généralisé sur le métabolisme cellulaire, impactant différentes voies primordiales dans le développement et la progression tumorale que nous détaillerons dans le **Chapitre I. paragraphe D.4.d.**

B.2. La codélétion 1p19q

La codélétion 1p19q est le résultat d'une translocation (1 ; 19)(q10 ; p10) avec la perte complète du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19. Cette codélétion est un marqueur indispensable pour prédire le diagnostic d'oligodendrogliome [1]. Elle représente également un facteur de bon pronostic, notamment dans les grades III [10, 11].

B.3. Les autres marqueurs moléculaires

D'autres marqueurs moléculaires d'intérêts pronostiques ou prédictifs à la réponse thérapeutique sont également intégrés à la classification OMS 2016 mais ils sont non essentiels au diagnostic tels que l'amplification d'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), la mutation TP53, la mutation d'*Alpha-Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked* (ATRX), la mutation de la *Telomerase Reverse Transcriptase* (TERT), la méthylation du promoteur *O6-méthylguanine-DNA méthyl transférase* (MGMT), la mutation de la *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) et la mutation de H3K27M.

B.3.a. L'amplification d'EGFR

L'amplification de l'EGFR abouti à un transcrit mutant dont la forme majoritaire est l'EGFRvIII. Ce variant d'EGFR est essentiellement retrouvé dans les GHG et son expression est de mauvais pronostic.

B.3.b. La mutation TP53

La mutation TP53 correspond à la perte du gène suppresseur de tumeur p53. Le gène p53 régule l'arrêt du cycle cellulaire ou active la mort cellulaire via l'apoptose. La perte de ce gène est associée à une instabilité génomique qui favorise l'apparition de mutations génétiques successives responsables de la progression tumorale.

B.3.c. La mutation d'ATRX

L'ATRX participe au remodelage de la chromatine par l'incorporation d'histone au niveau des télomères, en particulier l'histone H3 en position K27 (H3K27M). Son rôle est de maintenir

inactif certaines séquences du génome en empêchant sa liaison avec des facteurs de transcription. La mutation du gène ATRX conduit à une altération de la fonction des télomères et de la méthylation de l'ADN. Elle est présente essentiellement dans les gliomes de grade II, III et dans les GBM secondaires [12]. Elle peut être également associée à d'autres mutations telles que IDH1^{R132H}, TP53 et virtuellement mutuellement exclusive à la co-délétion 1p19q.

B.3.d. La mutation de TERT

La télomérase TERT est une reverse transcriptase impliquée dans le maintien de l'intégrité des télomères. La mutation du promoteur TERT a pour conséquence l'allongement des télomères sans un contrôle de la régulation provoquant une prolifération cellulaire anarchique. Cette anomalie est très fréquente dans les GBM (80%) [13].

B.3.e. La méthylation du promoteur de MGMT

L'enzyme MGMT est impliquée dans la réparation de l'ADN par l'action d'agents alkylants. La méthylation de son promoteur est responsable d'une inactivation de l'enzyme, inhibant son rôle de protecteur de l'ADN. Cette altération a pour conséquence une meilleure réponse à la chimiothérapie par Témzolimide (TMZ), en particulier celle des GBM [14].

B.3.f. La mutation PTEN

Le gène PTEN est un gène suppresseur de tumeur inhibant la voie PI3K/AKT (**Chapitre I. paragraphe D.4.a.**). Cette mutation est présente majoritairement dans les GBM primaires (30-40%).

B.3.g. La mutation H3K27M

La mutation H3K27M consiste en une substitution de l'acide aminé méthionine par le résidu lysine en position 27 de l'histone H3. Depuis 2016, cette mutation représente une classification spécifique de grade IV, elle définit un gliome diffus de la ligne médiane. Son expression est de mauvais pronostic.

IV. LES GLIOMES DE HAUTS GRADES

D'après la classification de l'OMS 2016 [1], les GHG comprennent les gliomes anaplasiques représentés par les astrocytomes anaplasiques et les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III) et les GBM (grade IV).

A. L'ÉPIDÉMIOLOGIE

Les gliomes les plus fréquents sont les GBM (15%) [15] (**Figure 4**). Avec une prévalence estimée à 2 400 nouveaux cas par an en France, soit 4 cas pour 100 000 habitants, les GBM représentent les tumeurs gliales les plus répandues (54%). Malheureusement l'incidence des gliomes continue à augmenter chaque année, liée notamment par le vieillissement de la population car les GHG touchent davantage une population âgée de plus de 65 ans et particulièrement entre 74 et 85 ans [16]. De même que l'utilisation d'outils diagnostiques plus performants accroît le nombre de cas détectés.

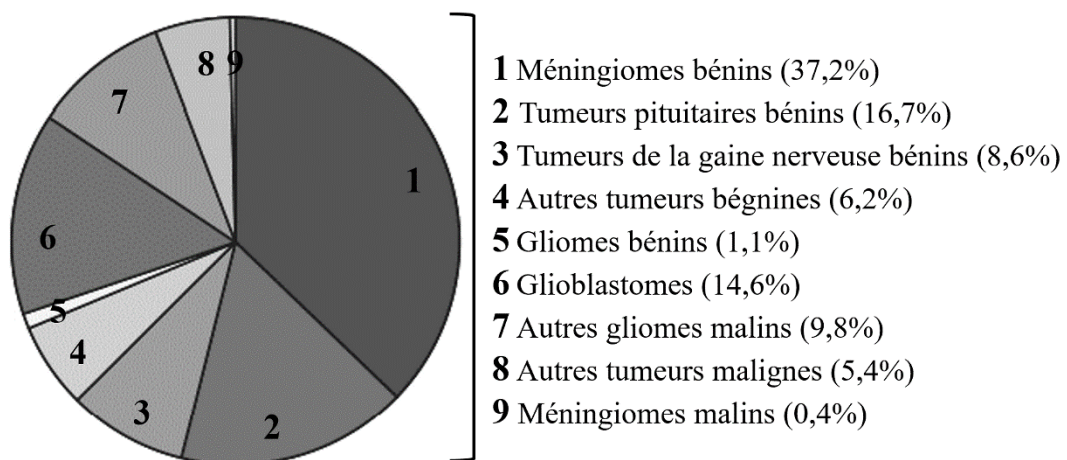


Figure 4. Distribution des tumeurs primitives du SNC d'après le rapport statistique du CBTRUS 2012-2016 [15].

B. L'ÉTIOLOGIE

L'étiologie des gliomes reste encore controversée, mais l'exposition externe à de fortes doses de rayonnements ionisants constitue un facteur avéré favorisant leur développement. Bien qu'en faible proportion (<1%), certains syndromes héréditaires peuvent être également associés à la survenue d'un gliome tels que la neurofibromatose de type 1, la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Li-Fraumeni et le syndrome de Turcot [1, 17].

C. LES CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES

A l'échelle macroscopique, les GHG se développent le plus souvent au niveau des hémisphères cérébraux dans les régions fronto-temporales et pariétales. Ces tumeurs présentent un aspect irrégulier, hétérogène et sont également très invasives avec une infiltration tumorale pouvant s'étendre du cortex au corps calleux et jusqu'au lobe controlatéral.

D. LES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES

D.1. La gliomagenèse

La gliomagenèse est le résultat d'évènements mutationnels successifs provoquant une prolifération incontrôlée de cellules d'origine gliale. L'apparition de ces altérations moléculaires au cours du développement tumoral permet de distinguer les GHG entre eux. En effet, les GBM primaires (*de novo*) et les GBM secondaires provenant de la progression d'un gliome de bas grade sont définis selon deux voies moléculaires distinctes (**Figure 5**) [18].

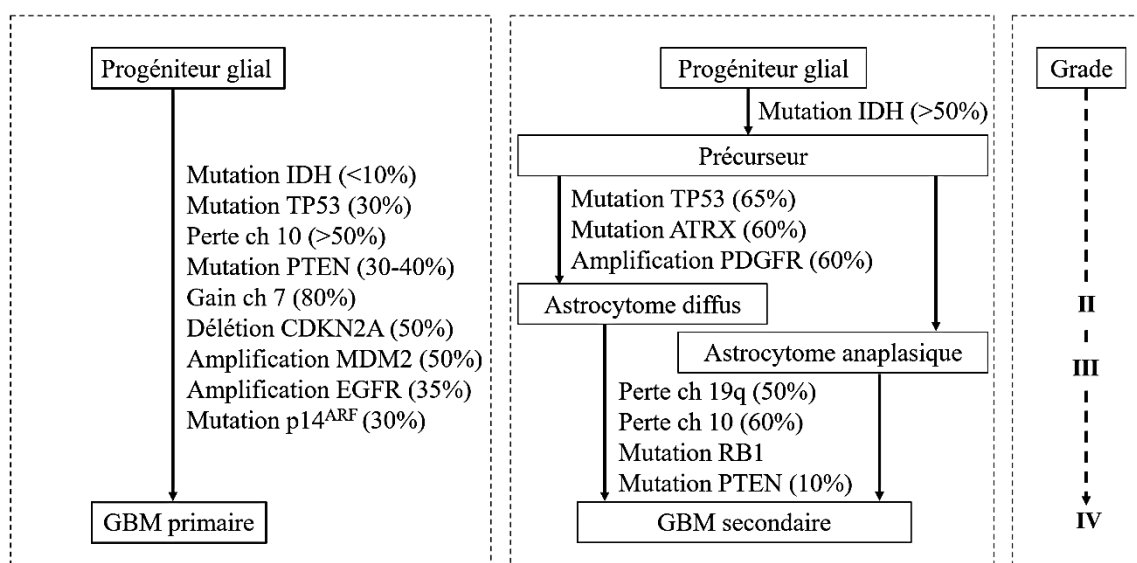


Figure 5. Profil moléculaire des voies de la gliomagenèse [18].

D.2. Les GBM primaires

Les GBM primaires représentent les GBM majoritaires (90%). Ils présentent un profil génique plus complexe que les GBM secondaires avec un gain du chromosome 7 (80%), une

amplification d'EGFR (35%) et une mutation de PTEN (30-40%). Cependant la mutation de TP53 (30%) et de l'IDH (<10%) sont plus rares.

D.3. Les GBM secondaires

Les GBM secondaires représentent 5 à 10% des GBM issus de gliomes de bas grades. Le phénotype du gliome anaplasique non codéleté 1p19q (grade III) est caractérisée par la présence de la mutation de TP53 (65%), de la mutation d'ATRX (60%) et de l'amplification de PDGFRA (60%), et contrairement aux GBM primaires, l'expression de la mutation de l'IDH1^{R132H} est significativement plus fréquente (>50%). Sa transformation en GBM secondaire est essentiellement caractérisée par la perte des chromosomes 10 (60%) et 19q (50%).

D.4. Les altérations des voies de signalisation cellulaire

Comme décrit précédemment, les GHG possèdent des signatures moléculaires différentes et l'ensemble de ces altérations génétiques responsables de leur développement sont issues principalement de trois voies de signalisation cellulaire avec la voie EGFR/ PI3K/PTEN/AKT, la voie p16^{INK4A}/RB1/CDK4 et la voie p53/MDM2/p14^{ARF} (**Figure 6**).

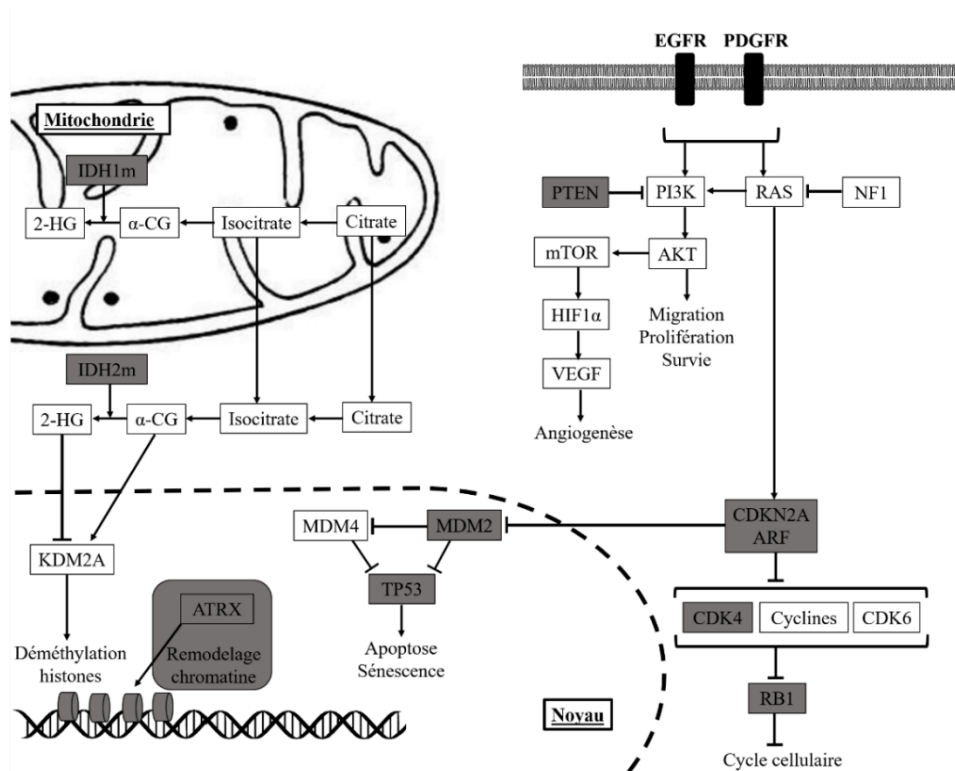


Figure 6. Principales voies de signalisation cellulaire altérées dans la gliomagenèse [14].

D.4.a. La voie EGFR/ PI3K/PTEN/AKT

En condition physiologique, cette voie est activée par la fixation des ligands EGF, TGF- α , PDGF sur les récepteurs EGFR ou PDGFR à activité tyrosine kinase (RTK). La fixation d'un des ligands sur le récepteur entraîne une cascade d'activation permettant le recrutement de la Phospho-Inositide-3-Kinase (PI3K) au niveau de la membrane plasmique. L'activité de phosphorylation de PI3K, transformant la Phosphatidyl-Inositol-4,5-biPhosphate (PIP2) en PIP3, induit l'activation de la protéine kinase B (AKT) et d'autres messagers, notamment la voie *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR). Cette voie de signalisation est responsable de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le contrôle de l'apoptose et de l'angiogenèse [19]. Elle est régulée négativement par l'activité phosphatase de PTEN en réduisant PIP3 en PIP2, provoquant le blocage de la voie PI3K.

Les anomalies de la voie PI3K sont retrouvées majoritairement dans les GBM primaires avec l'amplification du gène EGFR, l'amplification de PDGFR et la mutation de PTEN. Malgré les anomalies structurales de EGFR ou de PDGFR, les récepteurs conservent leur activité tyrosine kinase et activent de manière constitutive la voie de signalisation PI3K. Le variant III muté de l'EGFR est le plus fréquent (EGFRvIII) [20] et lorsqu'il est associé à la perte de l'activité de PTEN cela provoque une survie et une prolifération cellulaire incontrôlée, favorisant le développement et l'invasion des tumeurs gliales.

D.4.b. La voie p16^{INK4A}/RB1/CDK4

La voie du rétinoblastome 1 (RB1) est activée par le complexe *Cyclin-Dependent Kinase 4/Cyclin D1* (CDK4/Cycline D1). Après son activation, RB1 libère un facteur de transcription E2F permettant l'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement du cycle cellulaire [21]. Cette voie est régulée négativement par la protéine p16^{INK4A} codée par le gène suppresseur de tumeur 2A (CDKN2A) [22]. En effet, la liaison de p16^{INK4A} à CDK4 empêche la formation du complexe CDK4/Cycline D1, bloquant le cycle cellulaire.

Les altérations des gènes CDKN2A et RB1 sont principalement observés dans les GBM secondaires. Elles ont également pour conséquences une prolifération cellulaire incontrôlée.

D.4.c. La voie p53/MDM2/p14^{ARF}

La protéine p53 est codée par le gène TP53 représentant un gène suppresseur de tumeur. Il régule négativement le cycle cellulaire, lui-même contrôlé par le gène *Murine Double Minute*

2 (MDM2). L'association de MDM2 au gène codé par p14^{ARF} entraîne son inhibition et la dégradation de p53 [5]. Les altérations moléculaires de cette voie sont plus fréquentes dans les GBM secondaires [23]. L'ensemble de ces anomalies conduisent à une inactivation de p53, favorisant le développement du GHG [24].

D.4.d. **La mutation IDH1^{R132H}**

Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à l'expression de la mutation IDH1^{R132H} sont encore mal connus. Il a été néanmoins démontré que l'accumulation du 2-HG, combiné à la diminution de l' α -CG et du NADPH (**Chapitre I. paragraphe B.1.**) entraînent des modifications dérégulant divers processus physio-métaboliques tels que la production d'espèces réactives oxygénées, la voie de l'hypoxie-1 α (HIF-1 α) et la méthylation de l'ADN.

D.4.D.I. LA PRODUCTION DE ROS

La production d' α -CG nécessite de réduire le NADP⁺ en NADPH. En condition physiologique, le NADPH produit est utilisé pour la réaction de réduction de nombreux anti-oxydants, le plus abondant étant le glutathion (GSH). En condition de l'expression de la mutation IDH1^{R132H}, la diminution d' α -CG et donc de NADPH ont pour conséquences l'accumulation d'espèces réactives oxygénées intracytoplasmiques (ROS). L'augmentation de ces ROS, en particulier le GSH induit des dommages de l'ADN provoquant l'apparition d'autres mutations, conférant à la cellule une sensibilité accrue au stress oxydatif [25, 26].

D.4.D.II. L'ANGIOGENESE

Le lien entre l'expression de la mutation IDH et l'angiogenèse tumorale n'est pas encore correctement établi. En effet, il a été décrit que l' α -CG intervient dans la régulation du facteur induit par l'hypoxie-1 α (HIF-1 α) [27]. L'HIF-1 α représente un régulateur de gènes de la néo-angiogenèse en réponse à l'hypoxie, notamment de l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) [28]. En conditions physiologiques, l' α -CG par l'activation d'une prolyl-hydroxylase (PHD) est responsable de la dégradation de HIF-1 α . En condition de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} est exprimée, la diminution de l' α -CG induit une stabilisation et une activation de l'expression de HIF-1 α intracytoplasmique et donc une activation de VEGF stimulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales [29][30]. Cependant, la PHD a également la capacité d'utiliser le 2-HG comme co-substrat, diminuant ainsi l'activité de HIF-1 α et sa signalisation [31].

D.4.D.III. L'HYPERMETHYLATION DE L'ADN

L' α -CG représente également un substrat à la méthylcytosine déoxyméthylase *Ten-Eleven Translocation* (TET) [32]. En conditions physiologiques, cette oxygénase régule négativement la méthylation de l'ADN. En condition de l'expression de la mutation IDH1^{R132H}, elle inhibe cette régulation provoquant une hyperméthylation de l'ADN [33] et une modification de la régulation transcriptionnelle de l'ensemble du génome dans ces tumeurs [34, 35]

E. LE DIAGNOSTIC

L'intérêt diagnostique de la mutation IDH1 a été décrit initialement par David Capper en 2009 [36], il a ensuite été reconnu par l'OMS en 2016 (**Chapitre I. paragraphe B.**).

E.1. L'anatomopathologie

Actuellement le diagnostic de certitude d'un GHG est donné par une preuve histologique issue d'une biopsie ou d'une pièce d'exérèse. Les critères essentiels au diagnostic GBM sont la présence de foyers de nécrose, notamment palissadique fortement évocatrice, associée ou non à la présence de foyers de prolifération endothélio-capillaire, les distinguant ainsi des astrocytomes anaplasiques (**Figure 7**). Des analyses immuno-histochimiques sont réalisées pour le phénotype glial de la tumeur, ces dernières exprimant classiquement *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) et/ou *Oligodendrocyte transcription factor* (Olig2). L'index de prolifération cellulaire est évalué à l'aide de l'anticorps anti-Ki-67. La recherche de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} en immunohistochimie est également un critère diagnostique pour différencier un GBM primaire (<10%) d'un GBM secondaire (>50%). En cas de négativité d>IDH1^{R132H} en immunohistochimie, la recherche de mutations minoritaires des gènes IDH1 et IDH2 est réalisée chez les patients de moins de 55 ans conformément aux recommandations de la classification OMS 2016.

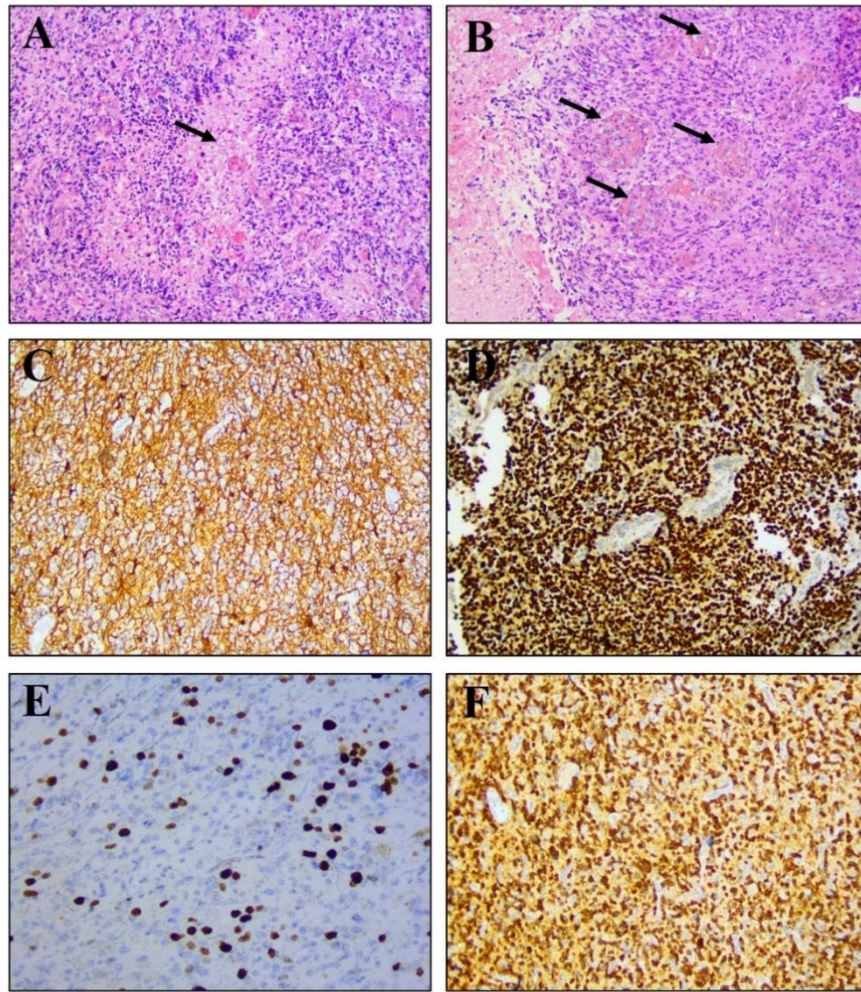


Figure 7. Images histologiques A] d'un foyer nécrotique et B] de la prolifération endothélio-capillaire par HES, et de marquages immuno-histochimiques C] d'Olig2, D] de GFAP, E] de Ki-67 et F] de la mutation IDH1^{R132H} dans un GBM.

D'autres altérations moléculaires à valeur pronostique ou théranostique sont susceptibles d'être analysées telles que l'expression d'EGFR, la mutation de la protéine p16 (CDKN2A), et la méthylation du promoteur MGMT, un facteur prédictif de bonne réponse au traitement par Témozolomide.

F. LE PRONOSTIC

L'expression de la mutation IDH1^{R132H} représente un facteur de bon pronostic dans les GHG. En effet, elle permet un allongement de la survie globale des patients de 63 mois en moyenne d'après l'étude de Mandel et al. en 2016 [37]. Des études cliniques ont démontré que son expression est associée à une meilleure réponse aux traitements thérapeutiques dans ces

tumeurs [2, 3]. Elle peut être en partie expliquée par une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales aux traitements comme mentionné dans le **Chapitre I paragraphe D.4.D.I.**

G. LA THERAPEUTIQUE

G.1. Le protocole Stupp

En complément de la résection chirurgicale, la stratégie thérapeutique standard des GHG est la combinaison de la radiothérapie et de la chimiothérapie selon le protocole dit *Stupp* [38] (**Figure 8**). Cette association des traitements permet de rallonger la durée médiane de survie des patients de 2,5 mois par rapport à la radiothérapie seule [38].

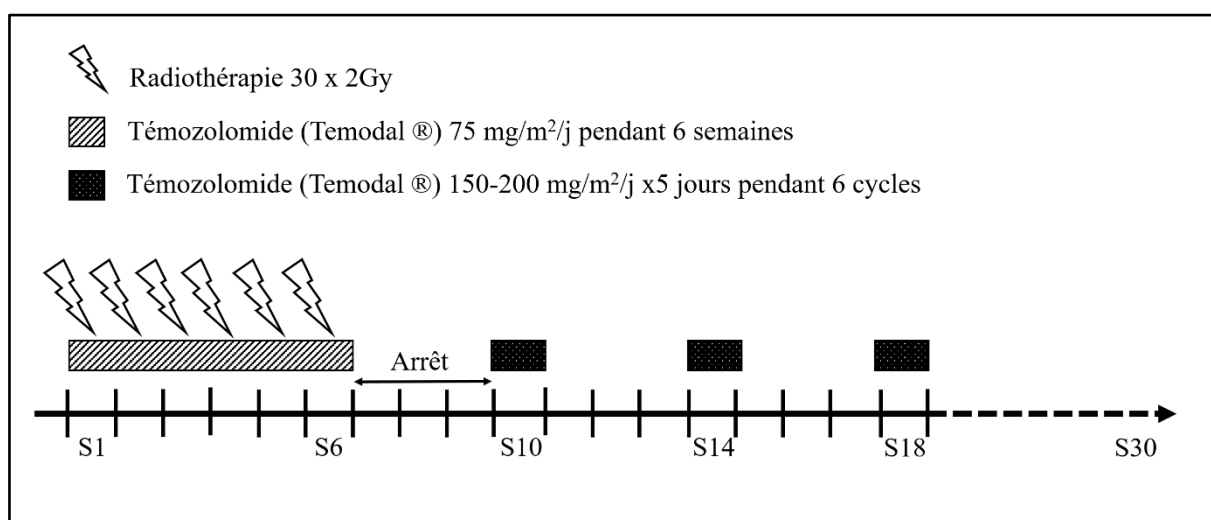


Figure 8. Protocole Stupp dans le traitement des GBM [36].

Néanmoins, il n'existe aucune thérapie efficace pour traiter les GHG. Une récurrence est systématique et les options de traitements en deuxième intention sont limitées. En ces conditions, l'entrée dans des essais cliniques pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques peut être proposée aux patients.

G.2. Les thérapies ciblées

De nombreuses études ont évaluées les effets des molécules anti-angiogéniques telles que le bevacizumab (Avastin®) ciblant le VEGF [39–41], l'aflibercept, un inhibiteur des isoformes du VEGF [42], le sorafenib, le sunitinib, ou le vandetanib des ITK de VEGFR [43] et le

cilengitide, un inhibiteur des intégrines $\alpha\beta3$ [44]. Cependant aucune n'a démontré de réelle efficacité clinique.

G.3. Les thérapies ciblant IDH1^{R132H}

Deux molécules inhibitrices ciblant la mutation IDH1^{R132H} l'AG-120 et l'AG-221 sont l'objet d'essais cliniques de phase I en cours [45]. Actuellement, l'AG-221 a montré des résultats préliminaires encourageant avec une absence de toxicité et une réduction du 2-HG sanguin en réponse à ce traitement. Les résultats de l'AG-120 sont encore attendus.

Un essai clinique de phase I/IIa incluant des patients porteurs de GBM a testé un vaccin anti-IDH1^{R132H} en traitement de première intention en complément du protocole *Stupp* mais aucune réponse au vaccin n'a pu être corrélée avec le statut de la mutation IDH1^{R132H} [46]. Une étude préclinique a cependant ouvert une nouvelle piste en démontrant une réaction immunitaire accrue des cellules Th1, des cellules lymphocytaires cytotoxiques, en réponse à un autre vaccin anti-IDH1^{R132H} par la production d'interférons-gamma (IFN- γ) sanguin [47]. Ce produit vaccinal évalué sur un modèle animal de sarcomes a réduit de manière significative la croissance tumorale mais son efficacité clinique reste néanmoins à prouver.

G.4. Les autres pistes thérapeutiques

D'autres stratégies sont à l'essai telles que la thérapie cellulaire qui progresse avec la technologie du *Chimeric Antigen Receptors (CAR)* des cellules T d'après l'article de Dunn et al.[48], le *Tumor Treating Fields (TTF)* qui consiste à appliquer un champ alternatif de faible intensité par des électrodes de surface provoquant la mort cellulaire tumorale [38] et la *photodynamic therapy (PDT)* par l'excitation laser de molécules photosensibilisantes provoquant la formation de ROS toxiques pour les cellules [49].

V. LA CONCLUSION

Les GHG sont les tumeurs les plus fréquentes du SNC mais aussi les plus graves. Les sous-types de GHG se distinguent par des signatures moléculaires différentes et notamment par la présence de la mutation IDH1^{R132H}. Depuis 2016, cette mutation a été intégrée dans la classification OMS des gliomes démontrant son importance diagnostique. Nous avons décrit précédemment que son expression est associée à une meilleure réponse aux traitements par chimio-radiothérapie lui conférant également une valeur pronostique d'un intérêt majeur. Aujourd'hui la détection de la présence de la mutation IDH1^{R132H} en routine clinique repose sur

des analyses anatomopathologiques nécessitant un acte invasif par biopsie ou par résection chirurgicale du gliome. Dans ce contexte, la possibilité de mettre en évidence la mutation IDH1^{R132H} exprimée dans les gliomes par de l'imagerie médicale non invasive représente un enjeu grandissant.

Chapitre II.

L'IMAGERIE MEDICALE

I. L'INTRODUCTION	34
II. L'IRM.....	34
A. LE PRINCIPE PHYSIQUE	34
B. LES SEQUENCES IRM DITES CONVENTIONNELLES	36
B.1. Le temps d'écho.....	36
B.2. Le temps de répétition.....	36
B.2.a. L'imagerie pondérée T ₁	36
B.2.b. L'imagerie pondérée T ₂	36
C. LES SEQUENCES MULTIPARAMETRIQUES	37
C.1. L'imagerie de diffusion	38
C.2. La perfusion	38
C.2.a. La méthode dite à l'équilibre	38
C.2.b. La méthode Dynamic Contrast-Enhanced	39
C.3. La spectroscopie	39
III. LA TEP	41
A. LE PRINCIPE PHYSIQUE	41
A.1. La détection	41
A.2. La quantification.....	42
A.3. Les volumes d'intérêts	42
B. LES ACQUISITIONS MULTIPARAMETRIQUES	43
B.1. Les paramètres statiques	43
B.2. Les paramètres dynamiques.....	43
C. LES RADIOTRACEURS	43
C.1. Le fluorodéoxyglucose	43
C.2. Les analogues aux acides aminés.....	44
C.2.a. Le [¹¹ C]-methyl-L-methionine	45
C.2.b. La 3,4-dihydroxy-6-[¹⁸ F]-fluoro-L-phenylalanine	46
C.2.c. La O-(2-[¹⁸ F]-fluoroethyl)-L-tyrosine	46
C.3. Les nouveaux radiotraceurs	47
C.3.a. L'angiogenèse	47
C.3.b. La neuro-inflammation	48
IV. LA RADIOMIQUE	49
V. LA CONCLUSION.....	50

I. L'INTRODUCTION

L'imagerie médicale dans le domaine de la neuro-oncologie apporte une aide au diagnostic, à la planification thérapeutique et permet également un suivi de l'efficacité thérapeutique [50]. Des nouvelles techniques d'imagerie multimodale ont émergé ces dernières années et bien que l'IRM reste l'examen de référence, la TEP offre une imagerie métabolique tumorale complémentaire intéressante. Par ailleurs, cette stratégie d'imagerie multimodale TEP/IRM a été récemment recommandée par le groupe RANO dans la prise en charge des gliomes [4]. Dans ce chapitre descriptif nous détaillerons les principes physiques de ces deux types d'imagerie et nous énumérerons les séquences qui seront appliquées à notre étude.

II. L'IRM

Nous avons choisi de caractériser l'expression de la mutation IDH1^{R132H} au sein de tumeurs U87-MG par l'acquisition *in vivo* de multiples paramètres IRM comprenant l'imagerie pondérée en T₂, la diffusion, la perfusion et la perméabilité des vaisseaux associée à de la spectroscopie. Certains de ces paramètres pris indépendamment sont connus comme des indicateurs métaboliques pertinents pour observer la mutation IDH1^{R132H} [26, 51–53], cependant aucune étude n'a combiné l'ensemble de ces paramètres dans cette indication.

Après un rappel sur le principe physique de l'IRM, les séquences précliniques que nous décrirons dans les paragraphes suivants sont le travail de développement de l'équipe IRMAGE de Grenoble.

A. LE PRINCIPE PHYSIQUE

Le principe de l'IRM repose sur les propriétés magnétiques des noyaux des atomes d'hydrogène constitué de proton (H⁺). Chaque proton dispose d'un vecteur magnétique, appelé *spin* à l'orientation aléatoire dans l'espace et dont la résultante magnétique est nulle. Lorsque les *spins* sont soumis à un champ magnétique, ils s'orientent parallèlement à ce champ, dans une position d'équilibre mais pas obligatoirement dans la même direction (**Figure 9**).

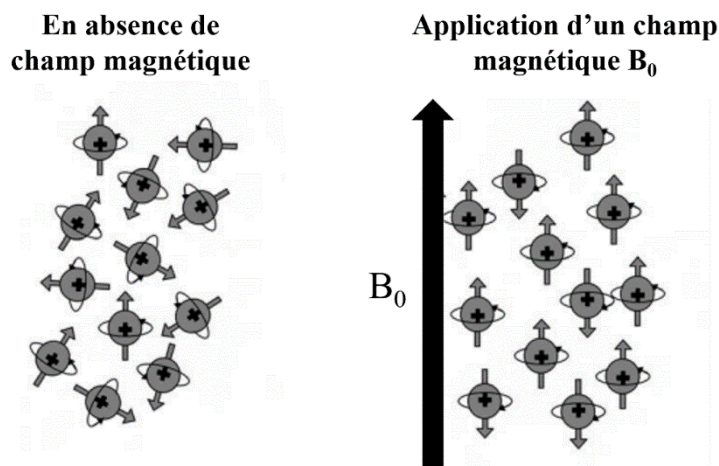


Figure 9. Alignement des spins en présence d'un champ magnétique B_0 [50].

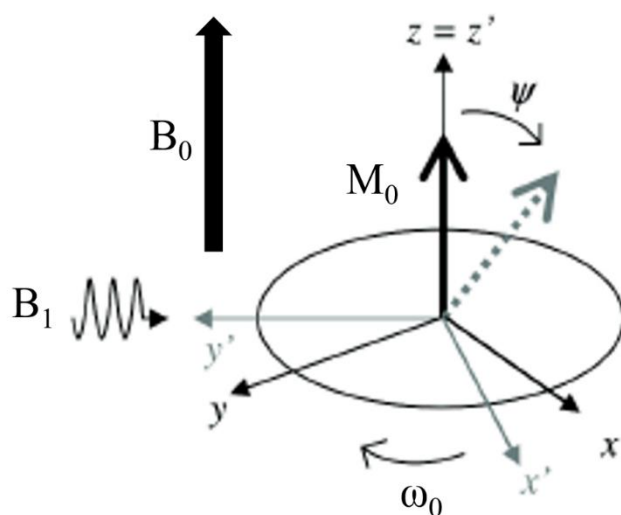


Figure 10. Exemple de l'émission d'une onde RF B_1 émise à la fréquence de Larmor ω_0 , avec le basculement de l'aimantation vers un plan transverse d'un angle Ψ [50].

Le signal RMN est déterminé selon deux phases, une phase d'excitation durant laquelle une onde de radiofréquence (RF) sera émise, suivi d'une phase de relaxation et de retour à l'état d'équilibre après l'arrêt de cette onde.

La phase d'excitation permet l'entrée en résonance du système. L'onde dont la fréquence est celle de Larmor entraîne le basculement du *spin* d'aimantation qui se traduit par une diminution de l'aimantation longitudinale, et l'apparition d'une aimantation transversale (**Figure 10**). L'angle de cette bascule dépend à la fois de l'intensité et de la durée du champ magnétique appliqué. Le retour à l'état d'équilibre du système correspond à la relaxation de l'aimantation

longitudinale déterminant un temps T_1 et à la relaxation de l'aimantation transversale par le déphasage des *spins* caractérisant un temps T_2 .

B. LES SEQUENCES IRM DITES CONVENTIONNELLES

Une séquence IRM est caractérisée par deux paramètres principaux, un temps d'échos (TE) et un temps de répétition (TR). Ils déterminent les images pondérées en T_1 et en T_2 , la base de l'imagerie en neuro-oncologie.

B.1. Le temps d'écho

Le TE correspond à l'intervalle de temps entre le début d'une séquence, c'est-à-dire à l'application de l'onde RF et l'apparition du signal. La variation du TE permet de modifier la pondération des images. En effet, pour un TE court, le signal dépendra majoritairement de la relaxation longitudinale, les images seront pondérées en T_1 . A l'inverse, un TE long dépendra de la relaxation transversale, les images seront alors pondérées T_2 .

B.2. Le temps de répétition

Le TR correspond à l'intervalle de temps entre le début d'une séquence et le début de la séquence suivante. Comme pour le TE, le TR peut modifier les pondérations des images. En effet, un TR court empêche les atomes d'hydrogène de revenir à leur position d'équilibre avec une aimantation longitudinale incomplète, pondérant alors les images en T_1 . A l'inverse un TR long génère des images pondérées en T_2 .

B.2.a. L'imagerie pondérée T_1

Les images pondérées en T_1 sont issues de TE et de TR courts, comme décrit précédemment. Ces images permettent une évaluation anatomique des gliomes mais n'offrent pas un bon contraste, nécessitant dans la majorité des cas l'injection d'un agent de contraste tel que le gadolinium.

B.2.b. L'imagerie pondérée T_2

Les images pondérées en T_2 sont issues de TE et de TR longs. Une évaluation anatomique est également possible en pondération T_2 avec ou sans une suppression du signal liquidien appelé *Fluid Attenuation Inversion Recovery* (FLAIR). C'est à partir des images pondérées en T_2 que les volumes tumoraux sont déterminés dans la prise en charge des gliomes.

C. LES SEQUENCES MULTIPARAMETRIQUES

L'IRM est le seul examen d'imagerie de référence recommandé dans l'imagerie des gliomes. Les critères RANO recommandent notamment la réalisation de séquences IRM dites conventionnelles pour l'évaluation de la réponse aux traitements des gliomes (**Tableau 2 et Figure 11**).

Tableau 2. Critères RANO dans l'évaluation radiologique de la réponse aux traitements des gliomes [4].

Critères RANO	Réponse complète	Réponse partielle	Phase de stabilité	Progression
Prise de contraste en T₁	Absence de réhaussement	Réduction $\geq$ 50%	Réduction $\geq$ 50% ou augmentation $<$ 25%	Augmentation $\geq$ 25%
Hypersignal T₂ et/ou T₂-FLAIR	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse	Augmenté
Apparition de nouvelle lésion	Non	Non	Non	Oui
Prise de corticoïdes	Absence	Inchangée ou en baisse	Inchangée ou en baisse	-
Etat clinique	Stable ou amélioré	Stable ou amélioré	Stable ou amélioré	Dégradé
Nombre de critère à remplir pour une réponse	5	5	5	≥ 1

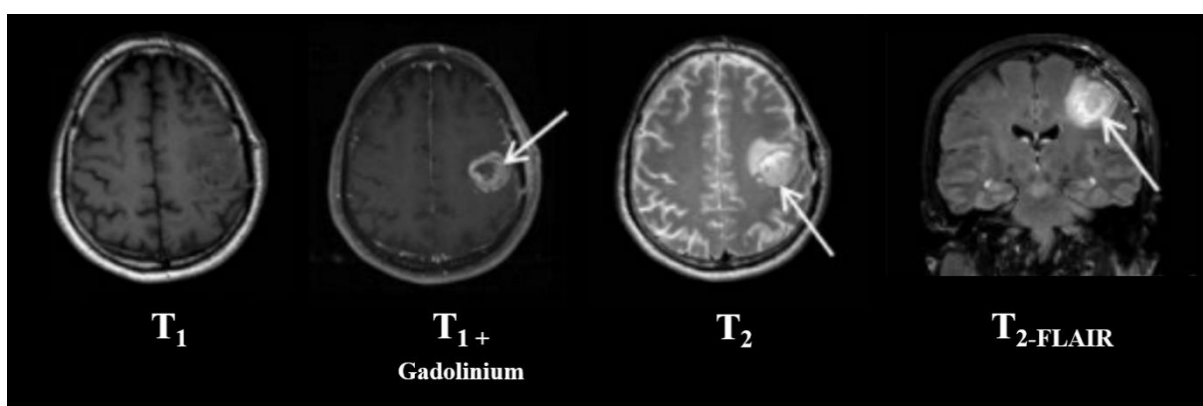


Figure 11. Séquences conventionnelles en IRM dans l'imagerie d'un GBM [50].

L'IRM offre également la possibilité d'évaluer une multitude d'autres informations différentes allant de l'imagerie anatomique haute résolution à l'imagerie fonctionnelle reflétant l'activité pathophysiologique et métabolique des tumeurs. L'enregistrement de plusieurs de ces séquences est appelé IRM multiparamétrique.

C.1. L'imagerie de diffusion

L'imagerie de diffusion reflète les déplacements des molécules d'eau dans un tissu. Elle est mesurée par un coefficient, appelé *apparent diffusion coefficient* (ADC), dont sa valeur augmente avec celle de la mobilité de l'eau.

Nous déterminerons l'ADC des tumeurs par l'application de plusieurs gradients b de diffusion dans les 3 directions orthogonales du champ magnétique.

Dans le cas des gliomes, il a été démontré que la variation de l'ADC est inversement corrélée à la densité cellulaire tumorale, pouvant représenter un critère aidant dans le *grading* tumoral initial [54]. En effet, la densité cellulaire augmente avec le grade tumoral, réduisant l'espace cellulaire et donc le passage de l'eau.

C.2. La perfusion

Les mesures de perfusion en IRM peuvent être obtenues selon deux approches. La première est une méthode dynamique dite à l'équilibre. Elle consiste à enregistrer une image avant et une image après l'injection d'un produit de contraste diffusible. La seconde est également une méthode dite dynamique qui consiste à enregistrer plusieurs images durant la diffusion du produit de contraste.

C.2.a. La méthode dite à l'équilibre

Plusieurs variantes de la méthode à l'équilibre existent. Nous détaillerons uniquement celles de notre étude.

C.2.A.I. LA METHODE DYNAMIC SUSCEPTIBILITY CONTRAST

La méthode de la *dynamic susceptibility contrast* (DSC) sera basée sur l'effet de la susceptibilité magnétique de particules de fer *Ultra Small Particles of Iron Oxid* (USPIO, Sinerem ®). En effet, l'USPIO a la propriété de rester dans le compartiment intra-vasculaire par rapport au gadolinium (Dotarem ®) et présente donc l'avantage de s'affranchir de l'état de la BHE dans

l'imagerie des gliomes [55, 56]. L'enregistrement de séquences pondérées en T_2 et T_2^* avant et après l'injection de l'USPIO permettra de quantifier trois paramètres vasculaires, le BVf, la densité vasculaire et le VSI. Les calculs de la quantification de ces paramètres seront décrits dans le **Chapitre V paragraphe D.1.**

C.2.A.II. LE MARQUAGE DES SPINS ARTERIELS

La technique de marquage de spins artériels (ASL) consiste à marquer les noyaux d'hydrogène de l'eau intra-artérielle en modifiant leur aimantation par une ou plusieurs impulsions RF. Bien que la quantification du CBF peut être obtenue par la méthode classique DSC, le marquage pseudo-continu de l'ASL permet une mesure plus robuste de ce paramètre en utilisant des impulsions de RF courtes pour marquer les spins du flux sanguin. Nous évaluerons donc le CBF par la technique du pCASL

C.2.A.III. LA METHODE QBOLD

La méthode qBOLD est utilisée pour une estimation des paramètres d l'oxygénation. En effet, elle repose sur la différence de susceptibilité magnétique entre l'oxy-hémoglobine et la désoxy-hémoglobine. L'enregistrement de séquences T_2^* permettra de quantifier la StO_2 . L'estimation du CMR_{O_2} associera l'effet BOLD à la mesure du CBF comme décrit dans le **Chapitre V paragraphe D.1.**

C.2.b. La méthode Dynamic Contrast-Enhanced

Une autre technique dynamique utilisée couramment dans l'imagerie des gliomes est la séquence *Dynamic Contrast-Enhanced* (DCE). Elle consiste à l'enregistrement de plusieurs images pondérées en T_1 durant la diffusion du gadolinium. Elle évalue la perméabilité vasculaire et fait état de la fonctionnalité des parois endothéliales. A partir des courbes de rehaussement de signal des tumeurs, nous déterminerons les paramètres du TTP, de la valeur maximale du signal, de l'AUC et du pourcentage de rehaussement du contraste.

C.3. La spectroscopie

La SRM apporte des informations sur la composition métabolique des tissus. Elle repose sur la connaissance des fréquences de résonance des noyaux d'hydrogène des métabolites. Ces métabolites sont définis par un déplacement chimique exprimé en partie par million (ppm) par rapport à un pic de référence. L'analyse quantitative de certains métabolites est le témoin du

processus de la gliomagenèse (**Figure 12**). Par exemple, la créatine (Cr) est un marqueur du métabolisme énergétique, elle est souvent considérée comme une valeur de référence. La choline (Cho) est un marqueur du renouvellement membranaire. Le N-acétylaspartate (NAA) est un marqueur de l'intégrité neuronale. Le lactate (LAC) et les lipides (LIP) sont des marqueurs de la nécrose tissulaire. La Myo-inositol (M-INS) est un marqueur des cellules gliales. Les GHG peuvent être ainsi caractériser par l'augmentation du rapport tCho/NAA, par un pic de lactate, de M-INS et de lipides.

Par cette technique SRM, de nombreuses études cliniques et précliniques ont également évalué le potentiel diagnostique de la mesure du spectre du 2-HG dans les gliomes exprimant la mutation IDH1^{R132H} [26, 52, 53, 57–61].

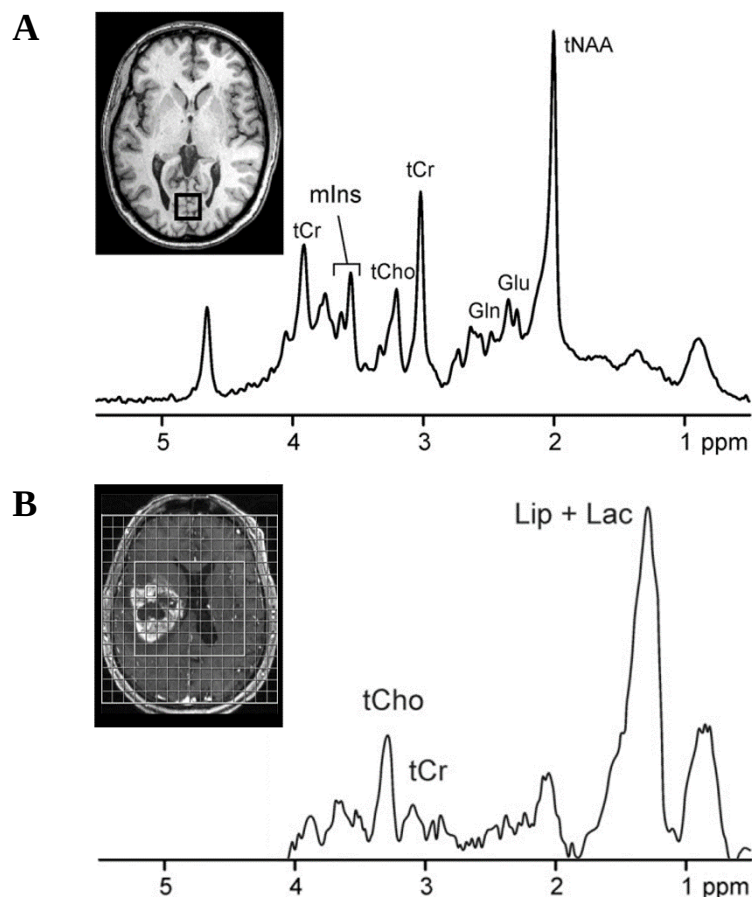


Figure 12. Exemple de spectre SRM dans A) du tissu cérébral sain et B) un GBM [58].

III. LA TEP

Le potentiel de la TEP comme l'outil d'imagerie complémentaire à l'IRM dans la caractérisation moléculaire des gliomes est en plein essor [50], cependant aucune n'étude n'a encore exploré la TEP multitraceurs et multiparamétrique avec la combinaison de données statiques et dynamiques dans l'analyse des gliomes comme ce que nous proposons dans notre étude.

A. LE PRINCIPE PHYSIQUE

La TEP est une technique d'imagerie reposant sur l'injection intraveineuse d'une molécule vectrice marquée d'un noyau atomique radioactif émetteur de positons (β^+), appelé radioisotope. Ce composé forme un radiotraceur capable de fixer sa cible d'intérêt telle que des récepteurs, des transporteurs, des enzymes ou d'autres molécules.

L'émission du positon (β^+), après un court parcours dans la matière, donne naissance à deux photons γ anti-colinéaires, dits photons d'annihilation. Ces deux photons de 511 keV sont émis à 180° l'un de l'autre et sont détectés par une couronne de détecteur à scintillation placés en anneau autour du patient repérant ainsi le lieu de la désintégration. Un système de collimation électronique identifie les photons appariés, ou en coïncidence, formant une ligne de réponse (LOR) entre les lieux d'interaction des deux photons. Les coïncidences détectées sont stockées sous forme de sinogramme qui sera ensuite reconstruit pour obtenir les images TEP en 3D. La caméra utilisée est généralement couplée à un appareil de tomodensitométrie (TDM) permettant le repérage anatomique et les mesures nécessaires à la correction de l'auto-atténuation (**Figure 13**).

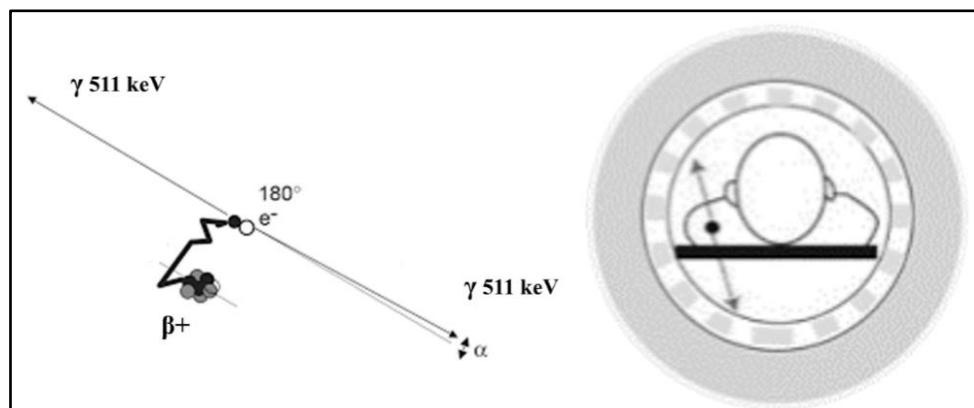


Figure 13. Réaction d'annihilation de deux photons γ [58].

A.1. La quantification

Sur les images TEP obtenues, l'intensité de fixation radioactive correspond à la quantité d'activité par voxel dans l'organisme du patient au moment de l'examen, exprimée en Bq/mL. Cette unité est cependant convertie en *Standard Uptake Value* (SUV) pour normaliser les images et rendre les examens inter-patients comparables avec une valeur théorique de SUV égale à 1 dans un organisme en condition physiologique.

$$SUV = \frac{\text{Activité (KBq/mL)}}{\text{Dose injectée (KBq)/Poids patient (g)}} \quad [1]$$

A.2. Les volumes d'intérêts

Les valeurs de fixation radioactive sont extraites des images TEP par la création de *volume of interest* (VOI). Dans le cas d'un gliome, une VOI est généralement positionnée sur la tumeur et une autre sur le centre semi-ovale représentant la zone de normalisation par le cerveau sain. Pour notre étude chez le rat, nous utiliserons le striatum controlatéral de la tumeur pour cette normalisation. A partir de ces VOI, il est possible de déterminer plusieurs mesures de SUV telles que le SUV_{mean} correspondant à la fixation moyenne des voxels contenus dans la VOI, le SUV_{max}, correspondant à la fixation maximale des voxel contenus dans la VOI et le SUV_{peak} correspondant à la fixation moyenne maximale d'une VOI de 1 cm³ [62]. Le SUV_{peak} sera cependant adapté à notre modèle animal avec une taille de VOI tumorale réduite à 5 mm³.

Contrairement à l'IRM, les VOI en médecine nucléaire représente des *Metabolic Tumor Volume* (MTV). Ils correspondent au volume de la segmentation tumorale définie par un seuil d'activité radioactive. Il n'existe aucune méthode de segmentation de référence, néanmoins dans notre étude, nous seuillerons les images en SUV_{mean} et en SUV_{max} selon les recommandations RANO [4] ou selon notre propre expérience pour les nouveaux radiotraceurs. Cette partie sera détaillée dans le **Chapitre VI. Paragraphe D.2.**

B. LES ACQUISITIONS MULTIPARAMETRIQUES

La TEP multiparamétrique associe des paramètres statiques aux paramètres dynamiques dans l'interprétation des images. Cette approche multiparamétrique sera évaluée dans la caractérisation métabolique de la mutation IDH1^{R132H} de notre modèle de GHG.

B.1. Les paramètres statiques

Un des paramètres les plus utilisés en neuro-oncologie est le rapport d'activité TBR. Dans le cas de notre étude, nous calculerons le TBR_{mean} et le TBR_{max} à partir du SUV_{mean} ou du SUV_{max} de la tumeur divisée par le SUV_{mean} du striatum contro-latéral du rat.

B.2. Les paramètres dynamiques

Les VOI précédemment définies sur les images statiques, seront appliquées selon les mêmes coordonnées spatiales sur chacune des images dynamiques. Des courbes activité-temps (TAC), représentant l'évolution du SUV_{peak} de la tumeur en fonction du temps, seront générées. Nous analyserons la pente dans la phase tardive de la courbe, obtenue par une régression linéaire et appliquée à différents temps en fonction de chacun des radiotraceurs. Pour améliorer la robustesse de l'évaluation de la TAC, les données brutes seront ajustées avec un modèle non linéaire. A partir des TAC ajustées, nous déterminerons le TTP correspondant au temps entre le début de l'acquisition dynamique et l'obtention de la valeur maximale de captation (**Chapitre VI. Paragraphe D.2.**).

C. LES RADIOTRACEURS

C.1. Le fluorodéoxyglucose

Le fluorodéoxyglucose ($[^{18}F]$ -FDG) est le radiotraceur le plus répandu en oncologie générale. Cet analogue du glucose franchit la BHE et pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur du glucose, appelé GLUT-1 (**Figure 14**).

Dans le milieu intracytoplasmique, des hexokinases phosphorylent la molécule en fluorodésoxyglucose-6-phosphate ($[^{18}F]$ -FDG-6p) et la piège à l'intérieur de la cellule. Néanmoins son utilisation en neuro-oncologie est limitée par le manque de contraste lésionnel par rapport au tissu cérébral sain lié à son métabolisme glucidique élevé [63].

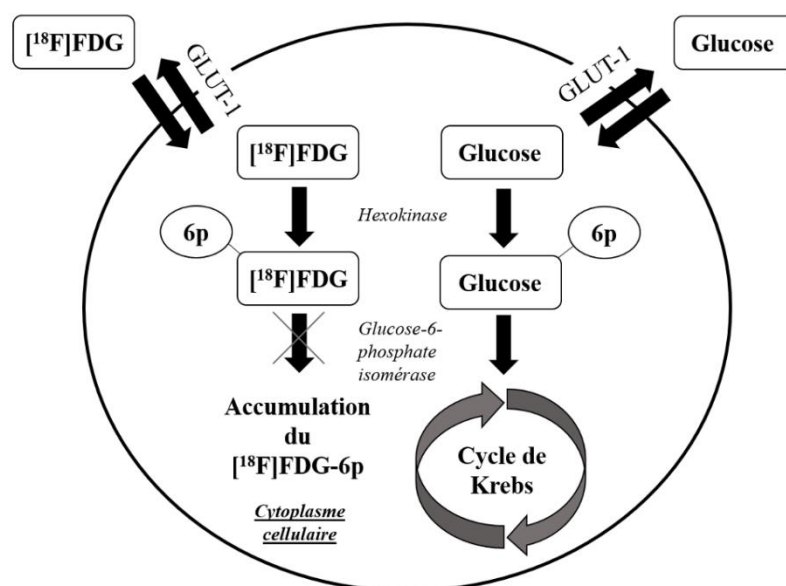


Figure 14. Captation du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ par un récepteur GLUT-1 transmembranaire [60].

C.2. Les analogues aux acides aminés

Trois principaux radiotraceurs à base d'acides aminés sont couramment utilisés, la 3,4-dihydroxy-6- ^{18}F -fluoro-L-phenylalanine ($[^{18}\text{F}]\text{FDopa}$), la O-(2- ^{18}F -fluoroethyl)-L-tyrosine ($[^{18}\text{F}]\text{-FET}$) et le ^{11}C -1-méthyl-L-méthionine ($[^{11}\text{C}]\text{-MET}$) (**Figure 15**).

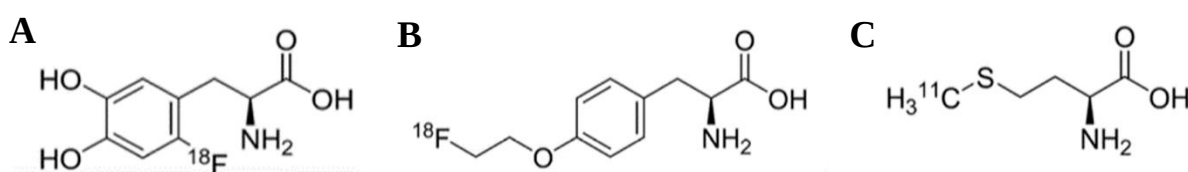


Figure 15. Structures radiochimiques A) de la $[^{18}\text{F}]\text{FDopa}$, B) de la $[^{18}\text{F}]\text{-FET}$ et C) de la $[^{11}\text{C}]\text{MET}$.

Ils franchissent la BHE et pénètrent dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs, appelés *L-type amino acid transporter 1 and 2* (LAT-1 et LAT-2). Le transporteur LAT-1 est spécifiquement surexprimé dans les gliomes et induit une augmentation de l'incorporation intracellulaire de ces radiotraceurs créant un net contraste entre la tumeur et le tissu cérébral

sain. Bien qu'ils entrent dans la cellule par le même transporteur LAT-1, le mécanisme de leur métabolisation est différent et n'est pas intégralement connu. Ces radiotraceurs permettent une meilleure caractérisation des gliomes [64] mais la corrélation entre le statut de la mutation IDH1^{R132H} et les paramètres de la TEP aux acides aminés reste encore incertaine et débattue [65].

C.2.a. Le [¹¹C]-methyl-L-méthionine

Le [¹¹C]MET est l'analogue dérivé d'acide aminé le plus étudié. La méthionine est un acide aminé indispensable dans divers processus biologiques tels que la synthèse protéique, les réactions de transamination et de transméthylation, la production d'acides ribonucléiques (ARN), de lipides et d'énergie. La source principale de méthionine est externe mais une synthèse *de novo* est possible à partir des produits issus de son catabolisme. Dans le processus de la gliomagenèse cette unique voie de synthèse interne est altérée provoquant une augmentation des besoins en méthionine de la cellule tumorale. La TEP au [¹¹C]MET exploite cette avidité et permet d'apporter des informations sur l'évaluation du grade tumoral au diagnostic initial [66] et la délimitation tumorale pour une chirurgie et/ou une radiothérapie [67, 68] (**Figure 16**). La production du [¹¹C]MET nécessite cependant un cyclotron à proximité car la demi-vie du carbone-11 est seulement de 20 minutes, ce qui en pratique limite son utilisation en routine clinique.

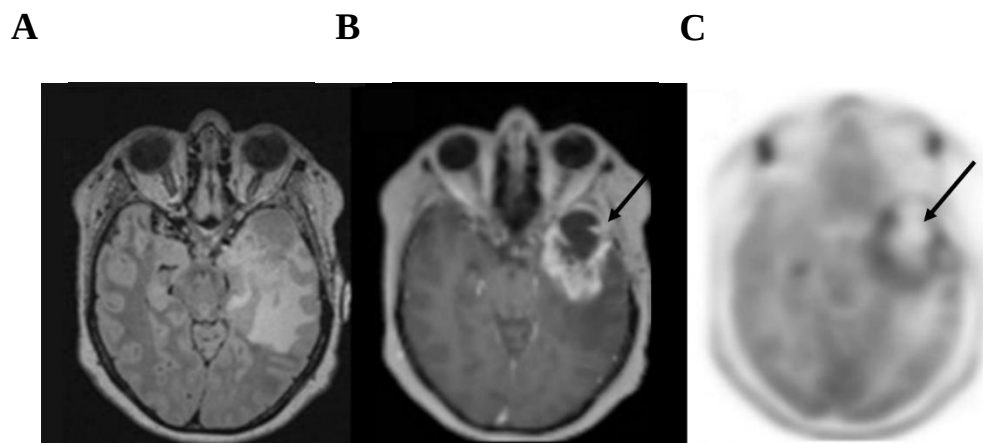


Figure 16. Imagerie TEP d'un GBM au [¹¹C]MET avec A) l'IRM T₂-FLAIR, B) le contraste T₁-Gadolinium et C) la fixation au [¹¹C]MET [65].

C.2.b. La 3,4-dihydroxy-6-[^{18}F]-fluoro-L-phenylalanine

La [^{18}F]FDopa est un radiotraceur précurseur de la dopamine. Elle permet l'exploration fonctionnelle du système dopaminergique pré-synaptique dans le cas de maladie neurodégénérative (**Figure 17**) mais elle est également largement utilisée dans l'étude des tumeurs cérébrales. Cet analogue de la dihydrophenylalanine (DOPA) est un substrat des transporteurs LAT-1 et LAT-2 permettant le passage du radiotraceur au travers de la BHE. Elle est ensuite captée par les neurones par un système de transport actif et est convertie en fluorodopamine par l'action de décarboxylases. Les indications de la [^{18}F]FDOPA sont multiples avec l'évaluation du grade tumoral au diagnostic initial [69], le suivi de la réponse thérapeutique des gliomes [70] et la détection de résidus ou d'une récurrence tumorale.

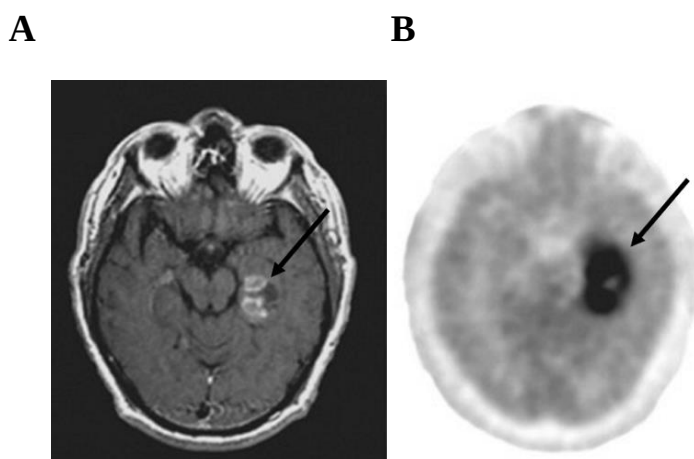


Figure 17. Imagerie TEP d'un GBM à la [^{18}F]FDopa avec A) l'IRM T₂-FLAIR et B) la fixation à la [^{18}F]FDopa [68].

C.2.c. La O-(2-[^{18}F]-fluoroethyl)-L-tyrosine

La [^{18}F]FET est un radiotraceur composé de tyrosine (**Figure 18**). La tyrosine est un acide aminé non essentiel. Elle est un substrat du transporteur LAT-2 permettant le passage du radiotraceur au travers de la BHE. Les indications de la [^{18}F]FET sont multiples avec l'évaluation du grade tumoral au diagnostic initial, le guidage des biopsies [71], la délimitation tumorale pour une chirurgie et/ou une radiothérapie [72] et la détection de résidus ou d'une récurrence tumorale.

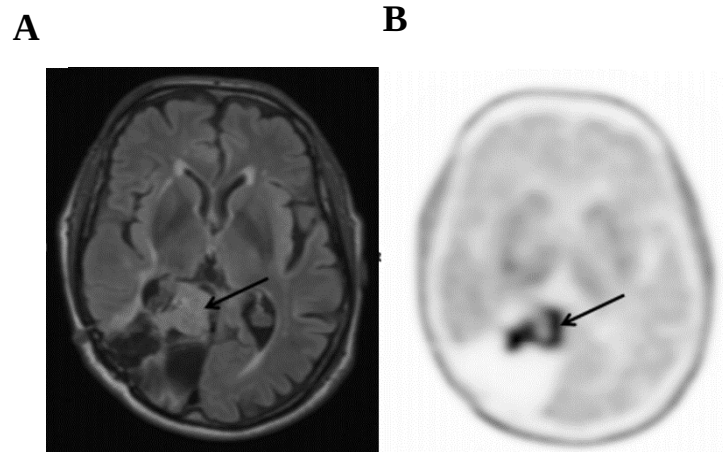


Figure 18. Imagerie TEP d'un GBM à la $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ avec A) l'IRM T₂-FLAIR et B) la fixation à la $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ [71].

C.3. Les nouveaux radiotraceurs

L'avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des gliomes a permis de découvrir de nouvelles cibles moléculaires offrant la possibilité de développer de nouveaux radiotraceurs TEP davantage spécifiques que ceux utilisés en routine clinique.

C.3.a. L'angiogenèse

C.3.A.I. LE $[^{68}\text{Ga}]\text{GA-NODAGA-(RGDYK)}$ DIMERE

Depuis 15 ans, de nombreux radiotraceurs ont été développés pour optimiser le marquage du peptide RGD (Arg-Gly-Asp) aux intégrines, notamment à l'intégrine $\alpha\beta_3$. L'intégrine $\alpha\beta_3$ est un récepteur glycoprotéique transmembranaire et hétérodimérique, composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Dans un cerveau sain son expression est très faible, mais elle est surexprimée dans le cas de la néo-angiogenèse et du remodelage vasculaire au niveau des cellules endothéliales mais également à la surface de certaines cellules tumorales [73–75]. C'est le cas de la lignée U87-MG que nous utiliserons dans notre étude.

Aucun des différents radiotraceurs développés ne passe la BHE. Néanmoins ils restent adaptés dans le cas de pathologies présentant une BHE lésée telles que les GHG. La plupart de ces molécules ont une conformation cycliques leur conférant une meilleure stabilité et une augmentation de la spécificité à l'intégrine [76].

Dans cette étude nous utiliserons un marquage du peptide au gallium-68 qui présente l'avantage d'une demi-vie plus courte que le fluor-18 (68 min *versus* 110 min) et une méthode de synthèse simplifiée avec un générateur [^{68}Ge]/[^{68}Ga] (Eckert & Ziegler®). Notre étude se concentrera sur l'évaluation du [^{68}Ga]-NODAGA-(RGDyK) $_2$ (**Figure 19**), apparaissant dans deux autres études sur le modèle cellulaire U87-MG [77, 78].

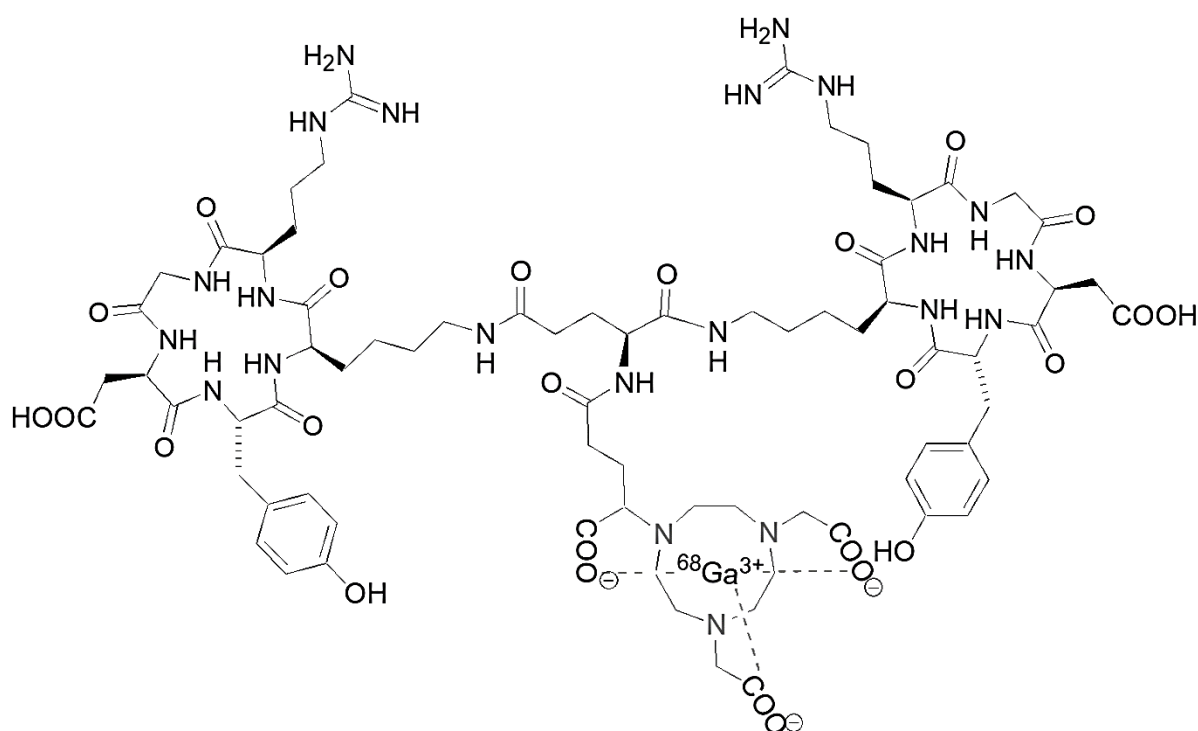


Figure 19. Structure radiochimique du [^{68}Ga]-NODAGA-(RGDyK) $_2$.

C.3.b. La neuro-inflammation

C.3.B.I. LE N,N-DIETHYL-2-[4-(2-[^{18}F]FLUOROETHOXY)PHENYL]-5,7-DIMETHYLPYRAZOLO[1,5-A]PYRIMIDINE-3-ACETAMIDE

De nombreux radiotraceurs ont été développés pour cibler le récepteur aux benzodiazépines périphériques (TSPO). La TSPO représente une protéine translocatrice de 18kDa constituée de 169 acides aminés organisés en 5 hélices α transmembranaires. Elle est principalement localisée à la surface de la membrane externe de la mitochondrie [79]. Dans un cerveau sain, son expression est très faible [80], alors qu'elle est surexprimée dans les gliomes [80, 81]. Cette surexpression interviendrait dans la régulation de la réponse à la neuro-inflammation par

l'activation de la microglie [82, 83]. En effet, en condition d'inflammation chronique observée dans le cas des gliomes, cette activation microgliale produit des médiateurs anti-inflammatoires tels que des cytokines (CTK) et des interleukines (ILK) diminuant ainsi la production de ROS et la sécrétion de *Tumor Necrosis Factor- α* . (TNF- α), une molécule pro-inflammatoire médiée par les macrophages.

Le composé [^{11}C]-PK11195 est issu de la première génération de radiotraceur au TSPO, il présentait cependant une fixation non-spécifique importante ce qui a conduit au développement de radiotraceurs de seconde génération plus spécifiques tels que le [^{18}F]-DPA-714 (**Figure 20**), le [^{18}F]-GE-180 et le [^{18}F]-PBR111. Comme pour le [^{68}Ga]-NODAGA-(RGDyK) $_2$, ces différents radiotraceurs ne passent pas la BHE mais ils restent indiqués dans le cas d'une rupture de la BHE. Dans notre étude, nous évaluerons donc le [^{18}F]-DPA-714 dans l'imagerie de l'inflammation tumorale dans le modèle de GHG exprimant la mutation IDH1^{R132H}.

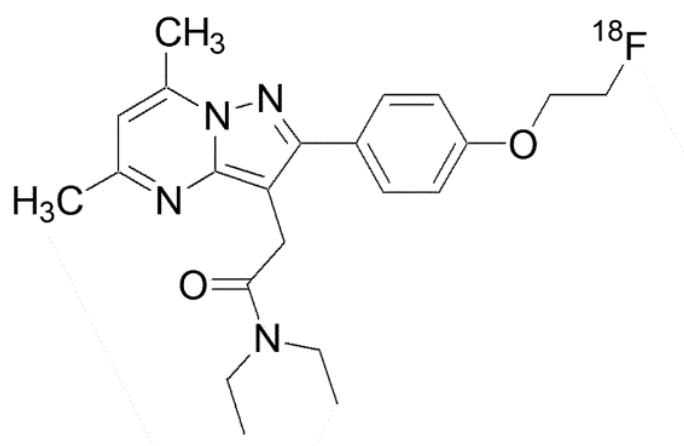


Figure 20. Structure radiochimique du [^{18}F]-DPA-714.

IV. LA RADIOMIQUE

La radiomique est une discipline récente qui repose sur l'imagerie médicale (**Figure 21**). Elle se base sur des algorithmes capables d'extraire de nombreux paramètres quantitatifs depuis l'image telles que des indices de densité, de texture et de forme (liste non exhaustive) et dont certaines ne sont pas visibles à l'œil nu. Elle est souvent associée à de l'intelligence artificielle

(IA) dans la modélisation des interactions entre les nombreux paramètres et les phénotypes tumoraux à caractériser. Ces différentes techniques permettraient à terme une meilleure caractérisation tumorale visant à mettre en place une médecine personnalisée et à améliorer la prise en charge des gliomes. La plupart des études en radiomique cherchant à prédire la mutation IDH1^{R132H} dans les GHG ont obtenu des résultats très prometteurs [84–86].

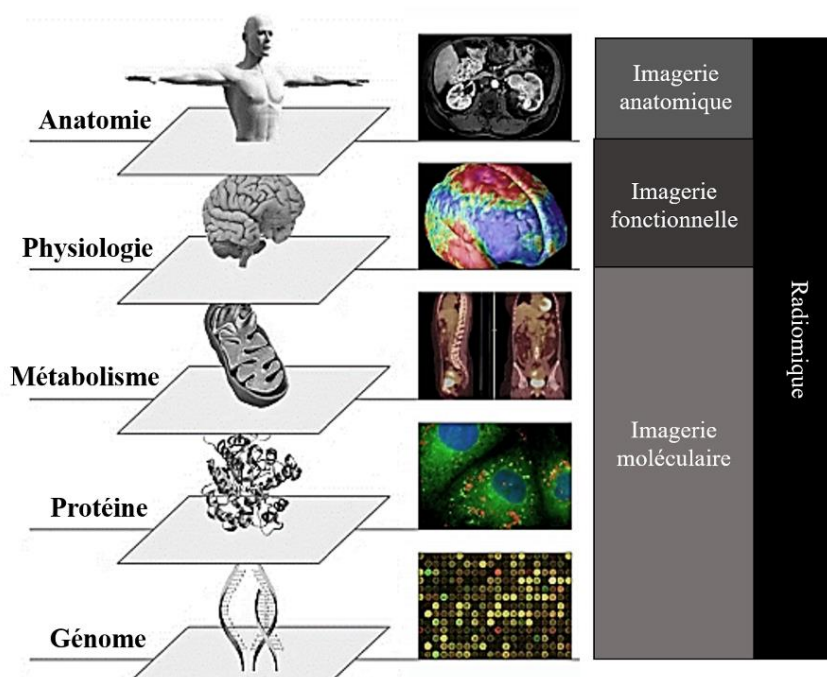


Figure 21. Représentation de la place de l'imagerie médicale dans la radiomique [90].

V. LA CONCLUSION

L'IRM et la TEP sont des techniques d'imagerie ayant montré un fort potentiel dans l'étude des gliomes. Chacune de ces imageries ont la capacité d'enregistrer de multiples paramètres associant des séquences statiques et dynamiques. En les combinant, comme ce qui a été recommandé par le groupe RANO, nous recoupons les informations complémentaires pour une caractérisation plus précise des tumeurs. Dans notre étude pour la caractérisation de la mutation IDH1^{R132H}, l'IRM apportera des informations à la fois anatomiques avec la mesure du volume de la tumeur (T₂-w) mais également des informations fonctionnelles en particulier sur la diffusion, la perfusion, la perméabilité vasculaire tumorale et sur le spectre métabolique des

tumeurs avec une séquence de SRM. En complément, la TEP fera état du métabolisme glucidique tumoral avec l'utilisation du [^{18}F]FDG, du métabolisme des acides aminés ([^{18}F]FDopa, la [^{11}C]MET et la [^{18}F]FET), de l'angiogenèse avec l'évaluation du [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et de l'inflammation tumorale avec le [^{18}F]DPA-714. Pour évaluer ces séquences d'imageries multiparamétriques et multimodales, nous avons fait le choix d'une approche expérimentale avec l'utilisation d'un modèle préclinique.

Chapitre III.

LE MODELE PRECLINIQUE

I. L'INTRODUCTION	53
II. LE MODELE DE LA LIGNEE CELLULAIRE	53
A. LA METHODE DU CRISPR/CAS9.....	53
B. LA LIGNEE U87-MG.....	54
III. LE MODELE ANIMAL	55
A. LE RAT.....	55
B. LA GREFFE ORTHOTOPIQUE	55
IV. LA CONCLUSION	56

I. L'INTRODUCTION

Dans notre démarche, l'étude de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} induite dans une lignée cellulaire de gliome humain s'est imposée comme l'unique moyen de mettre directement en évidence les réelles caractéristiques liées à cette mutation, indépendamment de l'effet des autres mutations et des critères propres aux tumeurs retrouvées chez les patients. C'est à la banque cellulaire ATCC que nous avons acheté la lignée U87-MG dérivant d'un GBM humain exprimant cette mutation, créée par la méthode génétique du CRISPR/Cas9.

II. LE MODELE DE LA LIGNEE CELLULAIRE

A. LA METHODE DU CRISPR/CAS9

Le CRISPR représente un locus composé de plusieurs répétitions de courtes séquences nucléotidiques intercalées d'espaces composés d'autres courtes séquences nucléotidiques variables. L'outil CRISPR/Cas9 a été décrit pour la première fois en 2012 par deux chercheuses, la française Emmanuelle Charpentier et l'américaine Jennifer Doudna. Aujourd'hui leurs recherches ont été récompensées par l'obtention du prix Nobel de chimie en 2020. A l'origine CRISPR/Cas9 est un mécanisme de défense des archées et des bactéries contre les virus. Cette protection est induite par la production de petits ARN CRISPR, appelé ARNcr. Ces ARNcr sont issus de la transcription du locus CRISPR et contiennent chacun une séquence complémentaire à une répétition et à un espaceur. Ils vont ensuite servir de guides en s'associant à une caspase *Cas* pour former un complexe de surveillance immunitaire. En effet, il a un rôle dans l'immunité adaptative, permettant à la fois de reconnaître le virus ayant déjà infecté ces microorganismes et d'amorcer la réponse de défense aboutissant à la section et à la destruction de l'ADN viral par la *Cas*. Les protéines virales ne sont donc plus produites et la réplication du virus est bloquée. Les chercheurs se sont donc intéressés à ce processus et l'ont détourné pour en faire un outil de modification ciblée du génome.

Dans le cas de l'édition du génome (**Figure 22**), le système CRISPR/Cas utilise la caspase *Cas9* et un second ARN, l'ARNtracr, nécessaire à la précision de la coupure de l'ADN. L'ARNcr fusionne à l'ARNtracr pour former un ARN guide unique (ARNg). L'ARNg cible la partie de l'ADN double brin à couper par la *Cas9*. Après cette coupure, la cellule a la possibilité de réparer son génome selon deux systèmes. Le premier est appelé *non-homologous end-joining* (NHEJ) et assure la continuité du génome endommagé par l'introduction de séquences aléatoires. Le deuxième est fondé sur la recombinaison homologue permettant d'introduire une

séquence d'ADN possédant des extrémités identiques à celles du génome à réparer. Ces composants du CRISPR/Cas9 d'origine bactérienne peuvent être introduits dans des cellules eucaryotes par l'intermédiaire de vecteurs. C'est la méthode qui sera utilisée par ATCC pour exprimer la mutation IDH1^{R132H} dans le cas de notre modèle cellulaire la lignée U87-MG.

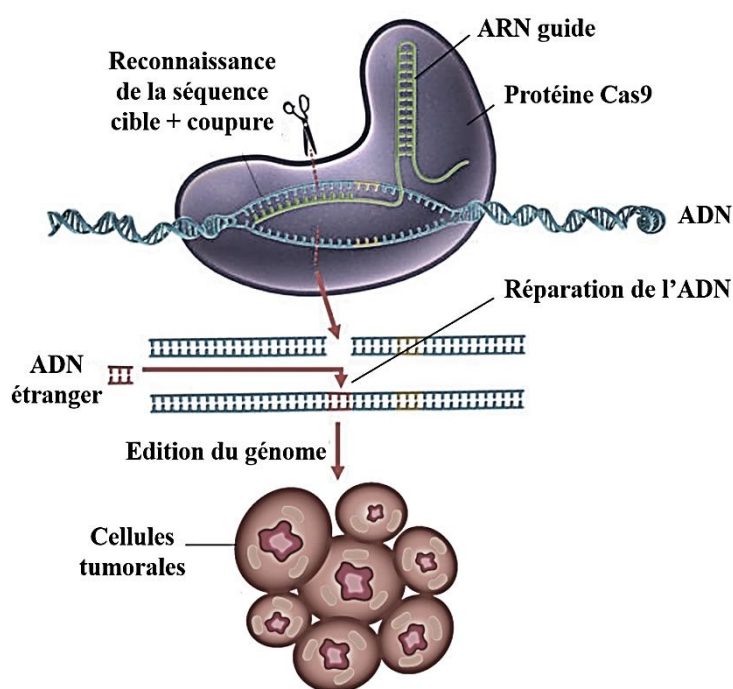


Figure 22. Principe du mécanisme du système CRISPR/Cas9 [83].

B. LA LIGNEE U87-MG

La lignée U87-MG a été mise en évidence en 1975, elle représente la lignée dérivant d'un GBM humain la plus couramment utilisée en recherche. Elle est caractérisée par une croissance circonscrite et présente peu de foyers de nécrose. Elle possède l'avantage d'exprimer des caractéristiques histologiques représentatives du GBM, telles que la présence de pléomorphisme cellulaire, des noyaux hyper-chromatiques et une forte densité [87–89]. Un autre avantage est la croissance rapide de la lignée U87-MG, à la fois *in vitro* et *in vivo* adaptée pour des études précliniques telles que la nôtre.

De nombreuses recherches ont étudié la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée U87-MG mais toutes dans le cas d'une surexpression de cette mutation [60, 90–92]. Une des originalités du

projet est l'utilisation d'une nouvelle lignée U87-MG exprimant la mutation IDH1^{R132H} introduite par la méthode du CRISPR/cas9. Cet outil génétique permet d'exprimer de manière « basale » et isolée cette mutation, ce qui n'a encore jamais été étudié. La disponibilité de sa lignée isogénique contrôle U87-MG non mutante pour IDH1^{R132H}, connue et parfaitement caractérisée comme décrit dans le paragraphe précédent est un autre avantage dans le choix de cette lignée pour notre étude.

III. LE MODELE ANIMAL

Les modèles animaux ont été développés très tôt dans la recherche en oncologie. Il existe deux types de modèles. Le premier est le modèle syngénique correspondant à la greffe de cellules ou de fragments tumoraux issus d'une espèce et qui seront implantés dans un animal hôte dérivant de la même espèce. Le deuxième est le modèle xénogénique correspondant à la greffe de cellules ou de fragments issus de tumeurs humaines, mais qui seront implantés dans ce cas dans un animal hôte d'une espèce différente. Pour ce dernier modèle cela implique d'utiliser des animaux immunodéficients.

Dans notre étude, nous utiliserons un modèle de tumeur xénogénique avec des cellules dérivant d'un GBM humain greffé à des rats *nudes*.

A. LE RAT

Le rat est l'espèce la plus répandue après la souris, dans le cadre de la recherche en oncologie. Il existe très peu de races de rats immunodéficients, mais la plus commune est le rat *nude*. Cette souche de rat athymique sans poils est déficiente en lymphocytes T, évitant ainsi le rejet de xénogreffes. Bien que les études faites sur les rongeurs présentent des avantages notamment en termes d'accessibilité et de facilité de manipulation, son inconvénient majeur est le manque de reproductibilité chez l'Homme. En effet, la différence de métabolisme entre le modèle murin et celui de l'humain, mais également la différence de phénotype tumorale des lignées établies par rapport aux tumeurs d'origines reflète peu la réalité des mécanismes de la gliomagenèse retrouvé chez l'Homme.

B. LA GREFFE ORTHOTOPIQUE

La greffe orthotopique consiste en une greffe de cellules ou de tissus localisée au site d'origine de la tumeur. Ce type de greffe a la particularité de se rapprocher davantage des mécanismes physiopathologiques produits chez l'Homme que le modèle de xénogreffe en sous-cutanée.

Dans le cas de notre protocole *in vivo*, la greffe de la lignée U87-MG sera réalisée dans le striatum droit du cerveau du rat. Cette procédure d'implantation tumorale a été validée par de nombreuses études précliniques [93–95], elle est simple et sans effet indésirable pour l'animal. Elle présente néanmoins l'inconvénient de devoir disposer d'une imagerie non invasive telle que l'IRM pour surveiller le développement tumoral en intracérébral.

IV. LA CONCLUSION

Dans notre étude pilote, la caractérisation de la mutation IDH1^{R132H} exprimée de manière basale par la méthode du CRISPR/Cas9 dans la lignée U87-MG dérivant d'un GBM humain est originale et apparaît comme l'unique moyen de mettre en évidence les effets physiopathologiques induits par son expression. Bien que les lignées établies telle que la lignée U87-MG ne reflète pas entièrement le phénotype tumoral des tumeurs retrouvées chez l'Homme, son utilisation est avantageuse à la fois par sa croissance rapide *in vivo* chez le rat dans le cas de greffe orthotopique et par la disponibilité de sa lignée non mutante pour IDH1 déjà caractérisée. Dans la démarche d'une étude translationnelle, nous avons suivi un plan d'expérience allant de la cellule *in vitro*, à la greffe orthotopique chez le rat et à l'application du protocole d'imagerie *in vivo* et enfin une analyse anatomopathologique *ex vivo* comme décrit dans les chapitres suivants (**Figure 23**).

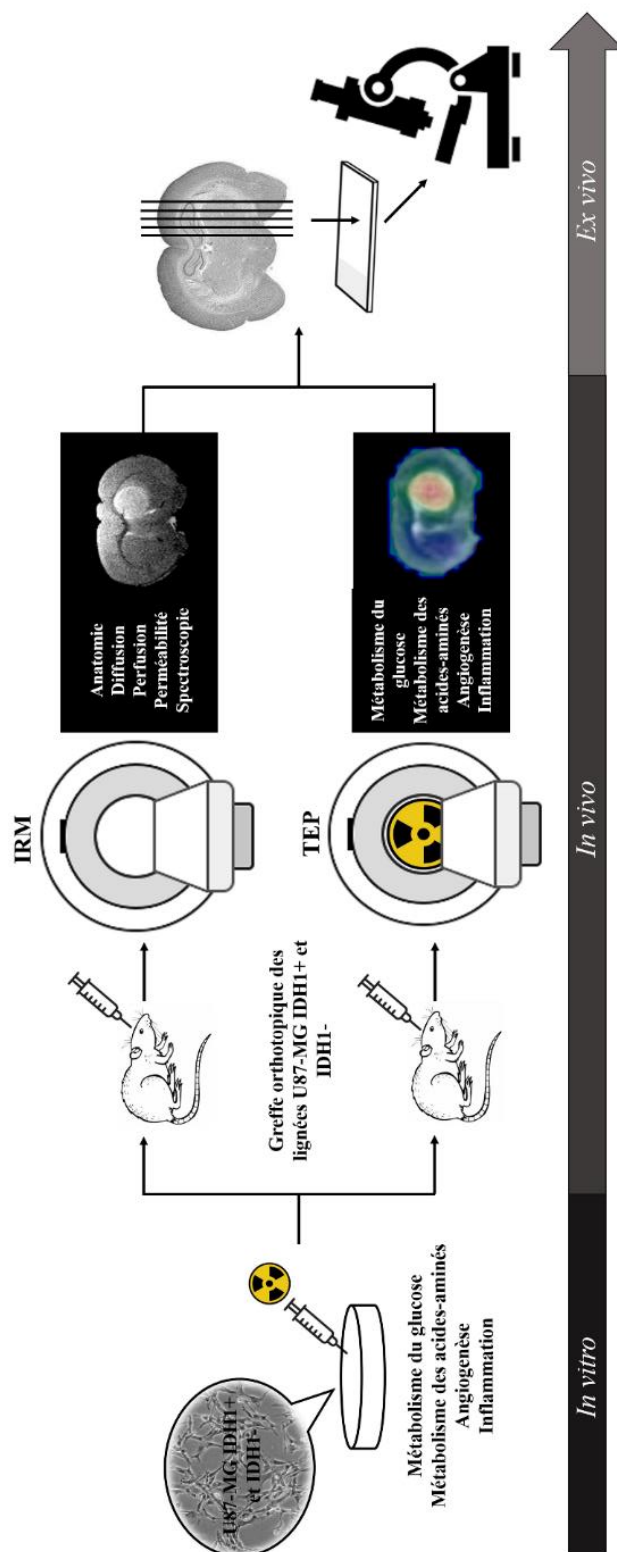


Figure 23. Organigramme du plan expérimental de notre étude.

Chapitre IV.

LA CARACTERISATION *IN VITRO* DE LIGNEES CELLULAIRES DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}

I. L'INTRODUCTION	59
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	59
A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-	59
B. LA VALIDATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H}	59
B.1. Le western blot	59
B.2. Le dosage du 2-HG	60
C. LES RADIOTRACEURS	60
C.1. La production clinique	60
C.2. La production R&D	60
C.2.a. La [¹⁸ F]FET	60
C.2.b. La [¹¹ C]MET	60
C.2.c. Le [⁶⁸ Ga]NODAGA-(RGDyK) ₂	61
C.2.d. Le [¹⁸ F]DPA-714	61
D. L'ETUDE DE LA CINETIQUE DES RADIOPHARMACEUTIQUES <i>IN VITRO</i>	61
E. L'ANALYSE STATISTIQUE	61
III. LES RESULTATS	62
A. LA CARACTERISATION Tumorale en <i>IN VITRO</i>	62
A.1. La confirmation de l'expression et de l'activité de la mutation IDH1 ^{R132H} dans la lignée mutante	62
A.2. L'analyse des cinétiques de captation des radiotraceurs dans les lignées tumorales	62
IV. LA CONCLUSION	63

I. L'INTRODUCTION

Pour commencer cette première étape nous avons analysé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} par Western Blot et vérifié son activité par un dosage du 2-HG intracellulaire dans la lignée mutante. Cette étape a été indispensable pour écarter toute suspicion de déviation de la lignée lors de son maintien en culture. Nous avons ensuite évalué la cinétique de captation intracellulaire des 6 radiotraceurs TEP d'intérêt avec le [¹⁸F]FDG, la [¹⁸F]FDopa, la [¹¹C]MET, la [¹⁸F]FET, le [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂, et le [¹⁸F]DPA-714 pour les deux lignées IDH1+ et IDH1-. Cette étude *in vitro*, à l'échelle de la cellule isolée, permet d'annuler les effets potentiels de l'environnement tumoral tel que la vascularisation ou la rupture de la BHE pouvant influencer la captation des radiotraceurs.

II. LE MATERIEL ET LES METHODES

A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-

Les lignées cellulaires U87-MG dérivant d'un GBM humain muté IDH1^{R132H} (IDH1+) et non muté IDH1 (IDH1-) ont été achetées à l'ATCC®. La lignée cellulaire IDH1+ (HTB-14IG) a été créée à partir de la lignée cellulaire parentale U87-MG (HTB-14) par la méthode génétique innovante du CRISPR/Cas9. Elle représente une mutation hétérozygote exprimant l'allèle mutant c.395G>A. Nous avons cultivé les deux lignées tumorales de manière identique, notamment avec un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher), complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) et 100 U/mL de pénicilline-streptomycine (PS). Ces cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ et 95 % d'air.

B. LA VALIDATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE LA MUTATION IDH1^{R132H}

B.1. Le western blot

Nous avons testé la présence de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée IDH1+ en Western Blot avec un anticorps secondaire IgG anti-IDH1^{R132H} (1:1000, DIA-H09, Dianova), un anti-GAPDH (1:1000, GTX100118, Genetex) et de la peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à un anticorps secondaire IgG de chèvre-souris (1:10 000, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology).

B.2. Le dosage du 2-HG

L'activité de la mutation IDH1^{R132H} a été mesurée par un dosage de la concentration en 2-HG intracellulaire. Nous avons pour cela collecté les cellules IDH1+ et IDH1- à confluence à la concentration de $1,10^7$ cellules/mL. Après avoir appliqué un protocole de préparation des cellules recommandé par le kit enzymatique utilisé (K213, BioVision Inc., San Francisco, CA), la concentration en 2-HG a été déterminée à partir des valeurs d'absorbance mesurées à 450 nm (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, France, Illkirch-Graffenstaden). L'absorbance était proportionnelle à la quantité de 2-HG présent dans les échantillons, exprimée en millimolaires (mM).

C. LES RADIOTRACEURS

C.1. La production clinique

Le [¹⁸F]FDG (FLUCIS®) et la [¹⁸F]FDOPA (DOPACIS®) ont été achetés auprès de Curium (Nancy, France).

C.2. La production R&D

L'ensemble des radiotraceurs R&D ont été produits par le laboratoire de Radiochimie à Nancyclotep.

C.2.a. La [¹⁸F]FET

La [¹⁸F]FET a été préparée à partir du composé O-(2-tosyloxyéthyl)-N-trityl-tyrosine tert-butylester (TET) sur l'automate All In One (AIO®) (Trasis, Belgique) [96]. Ce composé TET a été ensuite marqué au fluor-18 par une radio-fluoration nucléophile puis hydrolysé et purifié pour donner le produit final.

C.2.b. La [¹¹C]MET

La radiosynthèse de la [¹¹C]MET a été obtenue à partir de la réaction entre le composé [¹¹C]CH₃I produit par le cyclotron et le précurseur L-homocystéine sur l'automate AIO® (Trasis, Belgique) comme décrit précédemment [97].

C.2.c. Le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂

Le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ a été préparé avec un générateur [^{68}Ge]/[^{68}Ga] (Eckert & Ziegler®) et un automate mAIO® (Trasis, Belgique) selon une procédure similaire à celle publiée pour le [^{68}Ga]NODAGA-RGDyK [98]. Sans pré-purification de l'éluât, le précurseur (RGDyK)₂ a été marqué au gallium-68 par l'intermédiaire de la cage -NODAGA, puis purifié pour donner le produit final.

C.2.d. Le [^{18}F]DPA-714

La radiosynthèse du [^{18}F]DPA-714 a été faite sur l'automate AIO® à partir du précurseur tosylé OTs-DPA-714 (Pharmasynth, Estonie), comme décrit dans la littérature [99]. Ce composé intermédiaire a été marqué au fluor-18 par une radio-fluoration nucléophile puis purifié pour donner le [^{18}F]DPA-714 final.

D. L'ETUDE DE LA CINETIQUE DES RADIOTRACEURS *IN VITRO*

Les cellules IDH1+ et IDH1- ont été collectées à une concentration de $2.10^5/\text{mL}$ dans un tampon salin (HBSS) et réparties dans des tubes de 2 mL. Ensuite 1 MBq/mL de chaque radiotracer a été ajouté aux cellules et incubés sous agitation lente à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂ et 95% d'air. Les temps d'incubation ont été définis en fonction de la demi-vie des radio-isotopes, 30, 60 et 120 min pour le fluor-18 et le gallium-68 et 10, 20 et 30 min pour le carbone-11. A la fin de chaque temps, la réaction de captation a été stoppée par l'ajout d'une solution de phosphate saline (PBS) et d'une centrifugation. Ensuite, le culot cellulaire a été lavé par l'ajout de PBS froid et de deux centrifugations. Les cellules ont été remises en suspension dans 1 mL de HBSS et la radioactivité, exprimée en nombre de coups par minute (cpm) a été mesurée par un compteur gamma (Wizard, PerkinElmer®, France). A la fin de l'expérience, les cellules ont été récupérées pour un comptage manuel au bleu trypan pour obtenir un pourcentage de captation exprimé par million de cellules. Cette expérience a été répétée trois fois en duplicat (N=6/radiotracer/lignée).

E. L'ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisé sur le logiciel SPSS (IBM®, SPSS Statistics version 25.0). La valeur de significativité a été fixée à $p < 0,05$ et les variables ont été exprimées en moyennes $\pm$ les écarts types (ET). Ces variables ont été comparées par un test de Mann-Whitney.

III. LES RESULTATS

A. LA CARACTERISATION TUMORALE EN *IN VITRO*

A.1. La confirmation de l'expression et de l'activité de la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée mutante

Nous avons confirmé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée IDH1+ par le Western Blot (**Figure 24**), de même que son activité avec une concentration intracellulaire en 2-HG 2,25 fois plus élevée dans la lignée IDH1+ par rapport à la lignée non mutée IDH1- comme attendu (respectivement $0,09 \pm 0,03$ mM et $0,04 \pm 0,01$ mM, $p=0,04$).

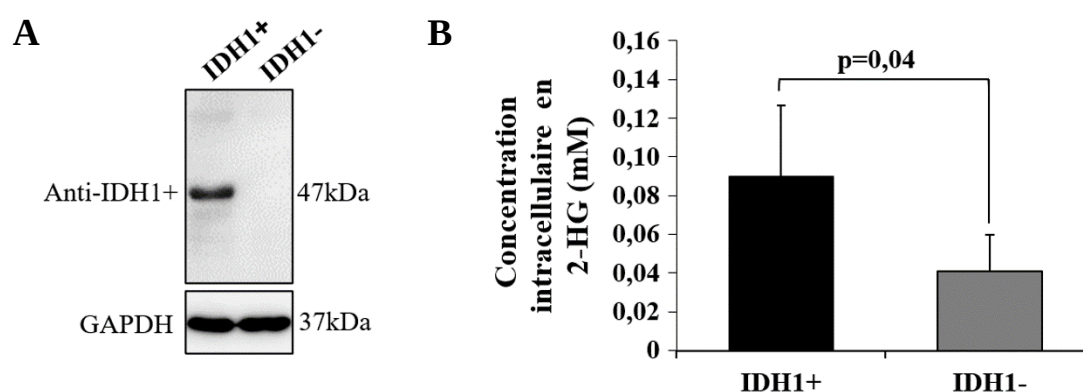


Figure 24. A) Expression de la protéine de la mutation IDH1^{R132H} par Western Blot dans la lignée cellulaire IDH1+. B) Concentration intracellulaire en 2-HG (mM) mesurée par l'absorbance spectrophotométrique pour les lignées cellulaires IDH1+ et IDH1-.

A.2. L'analyse des cinétiques de captation des radiotraceurs dans les lignées tumorales

La **Figure 25** résume les résultats de l'étude *in vitro*. Nous n'avons trouvé aucune différence dans les activités captées entre les cellules IDH1+ et IDH1- pour le [¹⁸F]FDG et les trois radiotraceurs à base d'acides aminés ($p>0,21$).

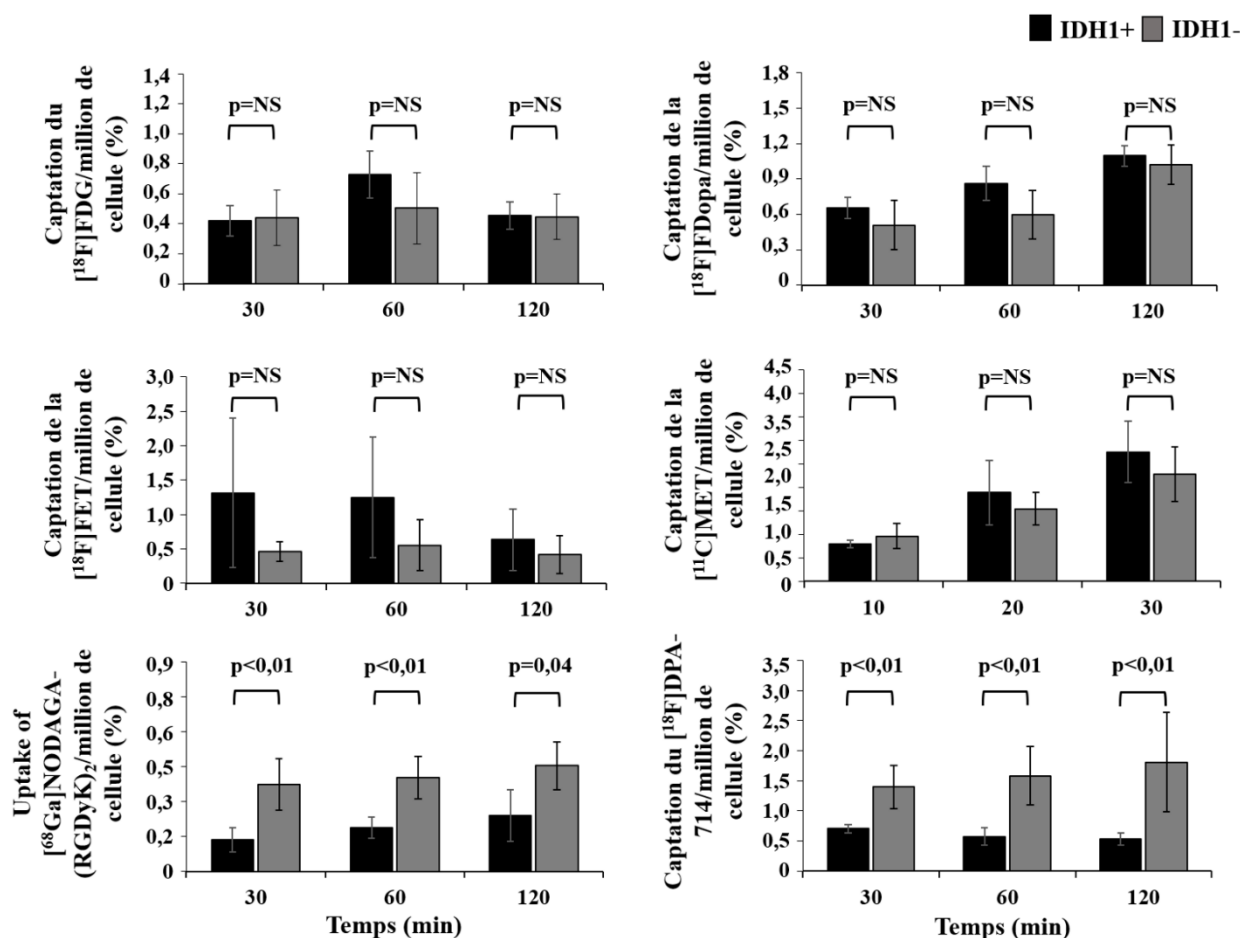


Figure 25. Histogrammes des analyses multitraceurs *in vitro* dans les lignées cellulaires IDH1+ et IDH1- à 30, 60 et 120 minutes après incubation des radiotraceurs excepte le $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ pour lequel les temps d'incubation ont été réduits à 10, 20 et 30 minutes.

Cependant, les cellules IDH1+ ont montré une captation significativement plus faible de $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ et de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ à chaque temps de mesure par rapport aux cellules IDH1- (respectivement 0,14, 0,19 et 0,24 % de captation/million de cellules à 30, 60, 120 minutes *versus* 0,37, 0,40 et 0,45 % avec $p \leq 0,04$ et 0,71, 0,57, et 0,53 % de captation/million de cellules à 30, 60, 120 minutes *versus* 1,40, 1,58 et 1,81 %, avec $p < 0,01$).

IV. LA CONCLUSION

Par l'expérience *in vitro* nous avons validé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée mutante. Nous avons montré que cette expression était associée à une captation significativement plus faible de $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ et de $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$. Ces résultats suggèrent une diminution de l'expression des intégrines $\alpha\beta 3$ et des récepteurs TSPO à la

surface des membranes des cellules tumorales. Par ailleurs, nous n'avons trouvé aucune différence notable pour le [^{18}F]FDG et les trois radiotraceurs à base d'acides aminés.

Chapitre V.

LA CARACTERISATION *IN VIVO* PAR IRM MULTIPARAMETRIQUE ET PAR SRM DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}

I. L'INTRODUCTION	66
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	66
A. LA CULTURE DES LIGNEES	66
B. LE MODELE ANIMAL.....	66
C. L'IRM.....	66
C.1. La procédure expérimentale.....	66
C.2. Les séquences IRM.....	67
C.2.a. La carte anatomique pondérée en T ₂	67
C.2.b. La carte du coefficient de diffusion apparent.....	67
C.2.c. La carte T ₁	68
C.2.d. La carte du flux sanguin cérébral	68
C.2.e. La carte T ₂	68
C.2.f. La carte de l'oxygénation	68
C.2.g. La carte du volume sanguin et de l'angiogenèse	68
C.2.h. La carte de la perméabilité vasculaire	69
D. LE TRAITEMENT DES IMAGES.....	69
D.1. Le calcul des cartes paramétriques	69
D.1.a. L'imagerie anatomique pondérée en T ₂	69
D.1.b. Le paramètre du coefficient de diffusion apparent	70
D.1.c. Le paramètre de la carte T ₁	70
D.1.d. Le paramètre du flux sanguin cérébral	70
D.1.e. Le paramètre du volume sanguin et les paramètres de l'angiogenèse.....	71
D.1.f. Les paramètres de l'oxygénation.....	71
D.1.g. Les paramètres de la perméabilité vasculaire	72
E. LA SPECTROSCOPIE.....	72
E.1. La séquence d'acquisition	72
E.2. La quantification des métabolites.....	72
F. L'ANALYSE STATISTIQUE.....	73
III. LES RESULTATS.....	73
A. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR IRM	73
B. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LES ZONES PERIPHERIQUES TUMORALES	77
C. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LE TISSU CEREBRAL SAIN	77
D. LES CARACTERISTIQUES DISCRIMINANTES DE LA MUTATION IDH1 ^{R132H} PAR IRM	77
D.1. L'analyse discriminante linéaire	77
D.2. Le clustering	78
E. LA CARACTERISATION DU PROFIL METABOLIQUE TUMORALE PAR SRM	80
IV. LA CONCLUSION	81

I. L'INTRODUCTION

Nous avons choisi de caractériser l'expression de la mutation IDH1^{R132H} au sein de tumeurs U87-MG par l'acquisition *in vivo* de multiples paramètres IRM comprenant la diffusion, la perfusion et la perméabilité des vaisseaux associé à de la spectroscopie. Certains de ces paramètres pris indépendamment sont connus comme des indicateurs métaboliques pertinents pour observer la mutation IDH1^{R132H} [26, 51–53].

II. LE MATERIEL ET LES METHODES

A. LA CULTURE DES LIGNEES

La méthode de culture des lignées U87-MG IDH1+ et IDH1- a été identique à celle décrite dans le **Chapitre IV paragraphe A**.

B. LE MODELE ANIMAL

Les cellules IDH1+ et IDH1- ont été injectées respectivement chez 11 et 9 rats mâles athymiques (200-250 g ; RH-Foxn1^{rnu} ; Envigo Gannat, France) [93]. Les rats anesthésiés avec un mélange d'air et d'isoflurane (1,5% et 2 %) et ont été placés dans un cadre stéréotaxique (900 M Kopf Instruments, Tujunga, CA). Après l'incision de la peau, un trou trépan a été percé à 0,5 mm en avant et à 2,7 mm en arrière du point bregma crânien. La suspension cellulaire de 5×10^4 cellules dans 5 μ L de HBSS a été injectée dans le noyau caudé droit à 4,4 mm de profondeur avec une seringue Hamilton de 10 μ L. Ensuite l'aiguille a été retirée 5 minutes après l'injection et le trou a été comblé avec de la cire osseuse. Enfin le crâne a été suturé et la plaie désinfectée.

L'ensemble de la procédure expérimentale *in vivo* a été approuvé par le Comité d'éthique lorrain N°66 (APAFIS n° 14056-2018031316365081).

C. L'IRM

C.1. La procédure expérimentale

Une IRM horizontale Biospec (4,7 T) dédiée au petit animal a été utilisée pour l'imagerie des tumeurs (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne, console Avance III, Paravision 5.0.1). L'ensemble des rats (N=11 IDH1+ et N=9 IDH1-) ont eu une imagerie anatomique pondérée en T₂ (T₂-w) acquise au 14^{ème} jour après la greffe orthotopique pour définir leur ordre de passage

dans le plan expérimental. En effet, le protocole d'IRM multiparamétrique a été appliqué le jour suivant en commençant par les rats portant les tumeurs les plus volumineuses afin de minimiser les variations du volume tumorale entre les deux groupes. Le temps d'acquisition total a été de 90 minutes par tumeur. Ensuite, l'enregistrement des données brutes a permis le calcul des cartes paramétriques suivantes : le volume tumoral, l'ADC, le BVf, le CBF, la densité vasculaire, le VSI, la CMRO₂, la StO₂, la carte T₁, la carte T₂, le TTP, la valeur maximale du signal, l'AUC et le rehaussement du contraste comme illustré dans la **Figure 26**.

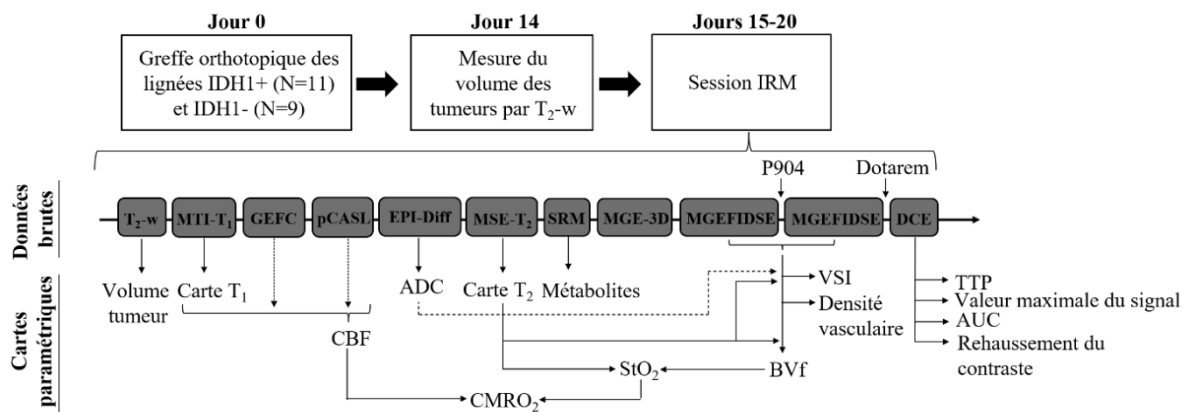


Figure 26. Organigramme du plan expérimental en IRM.

C.2. Les séquences IRM

Les paragraphes suivants décrivent les séquences IRM nécessaires afin d'obtenir les différentes cartes paramétriques.

C.2.a. La carte anatomique pondérée en T₂

Une image T₂-w a été réalisée à partir d'une séquence turbo-*RARE* avec les paramètres TR/ TE = 2200/36 ms, une taille de voxel = 117 × 117 × 800 μm³, 19 coupes de 1 mm, un champ de vue (FOV) = 30 × 30 mm².

C.2.b. La carte du coefficient de diffusion apparent

La carte de l'ADC a été déterminée à partir d'images en écho de spin appelées *Echo Planar Imaging* pondérées en diffusion (EPI-Diff) (TR = 2,2 s, TE = 33 ms, 5 coupes, FOV = 30 × 30

mm², une taille de voxel = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$). Un facteur de gradient de diffusion $b = 800 \text{ s/mm}^2$ a été appliqué dans 3 directions orthogonales avec $b = 0 \text{ s/mm}^2$ pour l'image de référence.

C.2.c. La carte T₁

Une image *Multi-inversion time-T1* (MTI-T1), associée à une image *flow-sensitive alternating inversion recovery sequence-echo planar imaging* (FAIR-EPI) avec les paramètres TR / TE = 8273/26,5 ms, une taille de voxel = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 coupes de 1 mm, une FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$) ont permis de définir la carte T₁.

C.2.d. La carte du flux sanguin cérébral

Ce paragraphe décrit les deux séquences nécessaires pour obtenir la carte du CBF.

Une image *Gradient echo with flow compensation* (GEFC) avec les paramètres TR / TE = 225/3,35 ms, une taille de voxel = $117 \times 117 \times 1000 \mu\text{m}^3$, une FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$. La séquence GEFC a permis le calcul de l'efficacité d'inversion (IE) du marquage du spin artériel.

Une image *Pseudo-Continuous Arterial Spin Labeling* (pCASL) avec une durée de marquage = 3 s, et un délai post-marquage = 400 ms. Le pCASL a été utilisé avec l'IE et la carte T₁ pour déterminer le CBF.

C.2.e. La carte T₂

Une image *Multiple spin-echo* (MSE) a été enregistrée avec les paramètres TR = 2000 ms, 26 échos de spin, une taille de voxel = $234 \times 234 \times 1 \mu\text{m}^3$, 5 coupes de 1mm, une FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$ pour déterminer la carte T₂.

C.2.f. La carte de l'oxygénation

A partir de la carte T₂, une image *mutli-gradient echo-3D* (MGE-3D) avec les paramètres TR = 100 ms, 15 échos de gradient = [4-67] ms, une taille de voxel = $117 \times 117 \times 200 \mu\text{m}^3$, une FOV = $30 \times 30 \times 0,52 \text{ mm}^3$ a été acquise pour obtenir la carte T2*. La combinaison des deux séquences a permis le calcul des paramètres StO₂ et CMRO₂.

C.2.g. La carte du volume sanguin et de l'angiogenèse

Une image *Multiple gradient echo sampling of the free induction decay and spin echo* (MGESFIDSE) avec les paramètres TR = 4000 ms, 34 échos de gradient = [2,3-92,3] ms, une

taille de voxel = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 coupes, une FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$ a été acquise avant et après l'injection des nanoparticules USPIO (P904, 133 $\mu\text{mol/kg}$ de poids corporel ; Guerbet, Roissy, France). Les variations de vitesse de relaxation transversales (ΔR_2 et ΔR_2^*) ont été obtenues à partir des signaux en écho de gradient et en écho de spin mesurés avant et après l'injection de l'USPIO. Cette séquence a permis le calcul du BVf, de la VSI et de la densité vasculaire.

C.2.h. La carte de la perméabilité vasculaire

La séquence DCE a été enregistrée sur 25 images à écho de spin pondérées en T_1 (T_1 -w) avec les paramètres TR / TE = 800/4 ms, une taille de voxel = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 coupes de 1 mm, une FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$. Après l'acquisition de 4 premières images, un bolus de Gd-DOTA (200 $\mu\text{mol/kg}$; Dotarem, Guerbet, Roissy, France) a été administré par la veine caudale.

D. LE TRAITEMENT DES IMAGES

A partir des données brutes IRM précédentes, les cartes ont été générées de manière automatique par le logiciel médical de traitement des images *Multiparametric Pipelines* (MP3) [100].

Pour l'ensemble des calculs de quantification, nous avons créé plusieurs régions d'intérêt (ROI) avec une ROI autour de la tumeur, une ROI en périphérie tumorale et une ROI dans le tissu sain controlatéral. Les ROI ont été délimitées manuellement sur les images T_2 -w de chaque cerveau de rat sur la coupe présentant la région tumorale la plus étendue. La ROI en périphérie de la tumeur a été placée de manière automatique à 2 pixels en-dehors de la tumeur. Pour le tissu sain, une ROI similaire à celle appliquée pour la tumeur a été positionnée sur le striatum controlatéral. Un exemple des cartes IRM et de la localisation des ROI pour les tumeurs IDH1+ et IDH1- est illustré dans la **Figure 27**.

D.1. Le calcul des cartes paramétriques

D.1.a. L'imagerie anatomique pondérée en T_2

Nous avons obtenu les volumes tumoraux à partir des images T_2 -w en créant une VOI sur la totalité de la tumeur par le logiciel Inveon (Inveon Research Workplace 4.1, Siemens®, Knoxville, USA).

D.1.b. Le paramètre du coefficient de diffusion apparent

L'ADC a été calculé à partir de la moyenne des ADC dans les 3 directions orthogonales.

D.1.c. Le paramètre de la carte T_1

Le calcul de la carte T_1 a été donné par l'équation suivante, corrigée de l'algorithme de Levenberg-Marquardt [101] :

$$M_z(TI) = M_0 \cdot \left(1 - 2\mathcal{K}e^{-\frac{TI}{T_1}}\right) \quad [2]$$

où M_z (TI) est le signal recueilli à chaque temps, M_0 est l'aimantation à l'équilibre, T_1 est le temps de relaxation longitudinale du tissu, et $\mathcal{K}$ est l'EI fixée à 1.

D.1.d. Le paramètre du flux sanguin cérébral

L'EI a été en premier déterminé par l'équation suivante :

$$EI = \left| \frac{Mc - M_L}{2Mc} \right| \quad [3]$$

où Mc et ML sont les signaux complexes du contrôle et du marquage carotidien respectivement. Une ROI a été dessinée manuellement sur chaque carotide. L'EI est le résultat de la moyenne des deux marquages carotidiens.

Ensuite les valeurs de l'EI et de la carte T_1 ont été utilisées pour déterminer le CBF sur la base de l'équation suivante [102–104] :

$$CBF = \frac{6000 \cdot \lambda \cdot \Delta M \cdot \exp(\omega/T_1^b)}{2 \cdot IE \cdot T_1^t \cdot M_0^t \cdot (1 - \exp(-\tau/T_1^t))} \quad [4]$$

où ΔM est la différence de signal entre les acquisitions du tissu contrôle et du marquage artériel, T_1^t est l'IE apparent du tissu de la carte T_1 , T_1^b est le temps de relaxation du sang (2430 ms) et M_0^t est l'aimantation du tissu à l'équilibre thermique et λ le coefficient de partage hémato-encéphalique de l'eau (0,9 mL/g).

D.1.e. Le paramètre du volume sanguin et les paramètres de l'angiogénèse

Le BVf, la VSI et la densité vasculaire ont été calculés à partir des variations entre la carte T_2 et T_2^* induites par l'injection de particules d'oxyde de fer [55, 56, 105] :

$$BVf = \frac{3}{4\pi\gamma\Delta X_{USPIO}B_0} (R_2^* \text{ après} - R_2^* \text{ avant}) \quad [5]$$

$$VSI = 0,425 \left(\frac{ADC}{\Delta X_{USPIO}B_0} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\Delta R_2^*}{\Delta R_2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad [6]$$

$$\text{Densité vasculaire} = 339 \frac{(\Delta R_2)^3}{(\Delta R_2^*)^2} \quad [7]$$

où γ est le facteur gyromagnétique du proton, B_0 la valeur du champ magnétique statique (T), $(\Delta R_2$ et $\Delta R_2^*)$ sont les variations de vitesse de relaxation transversale avant et après l'injection de l'USPIO et ΔX_{USPIO} , la différence de susceptibilité magnétique du sang avant et après l'injection de l'USPIO.

D.1.f. Les paramètres de l'oxygénation

La StO_2 a été estimé en utilisant une approche qBOLD [106] :

$$s(t) = Cte \exp \left[\frac{1}{T_2} t - BVf \gamma \frac{4}{3} \pi \Delta_{x_0} Hct (1 - StO_2) B_0 t \right] \quad [8]$$

où ΔX_0 est la différence de susceptibilité magnétique du sang oxygéné et désoxygéné, C_{te} est une constante de proportionnalité et Hct a été fixé à 0,375.

Ensuite la $CMRO_2$ a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$CMRO_2 = CaO_2 \times CBF \times (SaO_2 - StO_2) \quad [9]$$

où SaO_2 est la saturation en oxygène artériel, et CaO_2 , la teneur en oxygène artériel.

D.1.g. Les paramètres de la perméabilité vasculaire

La perméabilité vasculaire a été évaluée à partir de la courbe dynamique après l'injection de Gd-DOTA par les 4 paramètres dynamiques.

E. LA SPECTROSCOPIE

E.1. La séquence d'acquisition

Une séquence *Point RESolved Spectroscopy* (PRESS) a été réalisée afin de quantifier les concentrations en métabolites des tumeurs ($TR/TE = 2500 / 20$ ms, 400 moyennes). Nous avons fixé la VOI à $3 \times 3 \times 3$ mm³, placée au centre de la tumeur.

E.2. La quantification des métabolites

La quantification des spectres MR a été réalisée à l'aide du logiciel LCmodel (version 1.6) en utilisant une base de métabolites spécifique aux tumeurs cérébrales comprenant : le lactate (LAC), l'alanine (ALA), l'acide- γ -aminobutyrique (GABA), le N-acétylaspartate (NAA), le glutamate (GLU), la glutamine (GLN), le glutathion (GSH), l'aspartate (ASP), la choline totale (tCHO), la créatine (Cr), la phosphocréatine (PCr), la phosphocholine (PCh), la glycérophosphocholine (GPC), la taurine (TAU), l'inositol (INS). Le signal de l'eau a été utilisé comme référence pour estimer les concentrations absolues des métabolites. La fiabilité de la quantification a été évaluée en utilisant les bornes de Cramer Rao (CRLB) déterminées par l'algorithme de LCmodel, avec l'inclusion de toutes les valeurs $\leq 15\%$.

F. L'ANALYSE STATISTIQUE

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué en utilisant le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., version 9.4) et R (version 3.6.1). La valeur de significativité a été fixée à $p < 0,05$ et ajustée selon la correction de Benjamini-Hochberg.

Pour l'analyse univariée, les variables de tumeurs IDH1+ et IDH1- ont été exprimées en moyennes $\pm$ ET. Nous les avons comparées par des tests de Mann-Whitney ou par Kruskal-Wallis en cas de comparaisons multiples. Le test Lambda de Wilk a été utilisé en premier pour déterminer laquelle de ces variables contribuait de manière significative à la séparation entre les groupes IDH1+ et IDH1-, indépendamment du volume de la tumeur. Ensuite, ce sous-ensemble de variables a été introduit dans une analyse discriminante linéaire multivariable (LDA). Enfin, une analyse par *clustering* a été effectuée sur les cartes IRM incluant ces variables en utilisant la méthode *K means* avec un nombre optimal de clusters déterminé par une méthode heuristique de pente [107].

III. LES RESULTATS

A. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR IRM

Les résultats de l'analyse univariée sont détaillés dans le **Tableau 3** et illustrés dans la **Figure 27**.

Tableau 3. Analyse quantitative univariée des paramètres IRM pour les tumeurs IDH1+ et IDH1-, les zones tumorales périphériques et le tissu cérébral sain controlatéral. Un test de Kruskal-Wallis avec $p < 0,05$ a été réalisé pour les comparaisons entre les deux types de tumeur (*), la périphérie des tumeurs (†), les tumeurs IDH1+ versus le tissu cérébral sain controlatéral (#) et les tumeurs IDH1- versus le tissu cérébral sain controlatéral ().**

Paramètres IRM	IDH1+			IDH1-			P
	Tumeur	Périphérie tumorale	Tissu sain	Tumeur	Périphérie tumorale	Tissu sain	
Volume tumoral (mm ³)	9,63 ±4,11	-	-	18,30 ±5,76	-	-	0.01
ADC (mm/s)	870,08 ±19,54	726,17 ±25,02	724,47 ±12,77	828,45 ±25,05	815,78 ±40,86	723,52 ±20,55	*†,*,**
BVf (%)	8,33 ±1,26	5,07 ±0,66	3,30 ±0,48	7,14 ±0,86	5,44 ±0,67	3,10 ±0,28	*,**
CBF (mL/min/100g)	145,92 ±29,82	121,99 ±25,24	97,26 ±18,94	94,21 ±34,58	8,20 ±27,96	95,11 ±15,05	*,*,**
VSI (µm)	9,61 ±0,97	8,07 ±0,95	5,32 ±0,47	9,82 ±0,58	9,34 ±0,67	5,57 ±0,33	†,*,**
Densité vasculaire (vaisseau/mm ²)	223,78 ±20,80	191,79 ±29,99	279,66 ±22,96	181,86 ±21,23	180,03 ±16,44	258,63 ±13,15	*,*,**
CMRO ₂ (%)	3,16 ±1,68	4,85 ±2,38	4,52 ±1,80	2,38 ±1,09	4,25 ±2,03	4,65 ±1,64	*
StO ₂ (%)	88,74 ±4,50	81,72 ±6,28	76,19 ±9,12	87,29 ±3,70	78,47 ±5,72	73,78 ±7,95	*,**
Carte T ₁ (ms)	1811,58 ±51,68	1576,29 ±74,66	1517,79 ±24,41	1887,57 ±57,59	1649,09 ±58,85	1486,95 ±27,06	*,*,**
Carte T ₂ (ms)	82,34 ±2,04	71,01 ±2,06	67,59 ±0,91	82,01 ±1,86	76,30 ±2,34	67,80 ±1,04	†,*,**
TTP (s)	138,60 ±19,20	159,85 ±8,39	134,42 ±14,92	85,95 ±13,96	139,94 ±12,69	141,84 ±14,74	*,*,**
Valeur maximale du signal (S.I)	7,66 ±0,74	5,51 ±0,40	4,18 ±0,16	8,67 ±0,54	6,49 ±0,42	4,15 ±0,28	*,†,*,**
AUC (S.I)	32,24 ±7,48	10,67 ±3,59	1,56 ±0,75	38,12 ±6,14	19,06 ±3,55	1,70 ±0,43	*,†,*,**
Réhaussement du contraste (%)	68,76 ±14,68	27,04 ±7,10	8,49 ±1,61	84,43 ±14,89	43,76 ±7,56	8,72 ±1,09	*,†,*,**

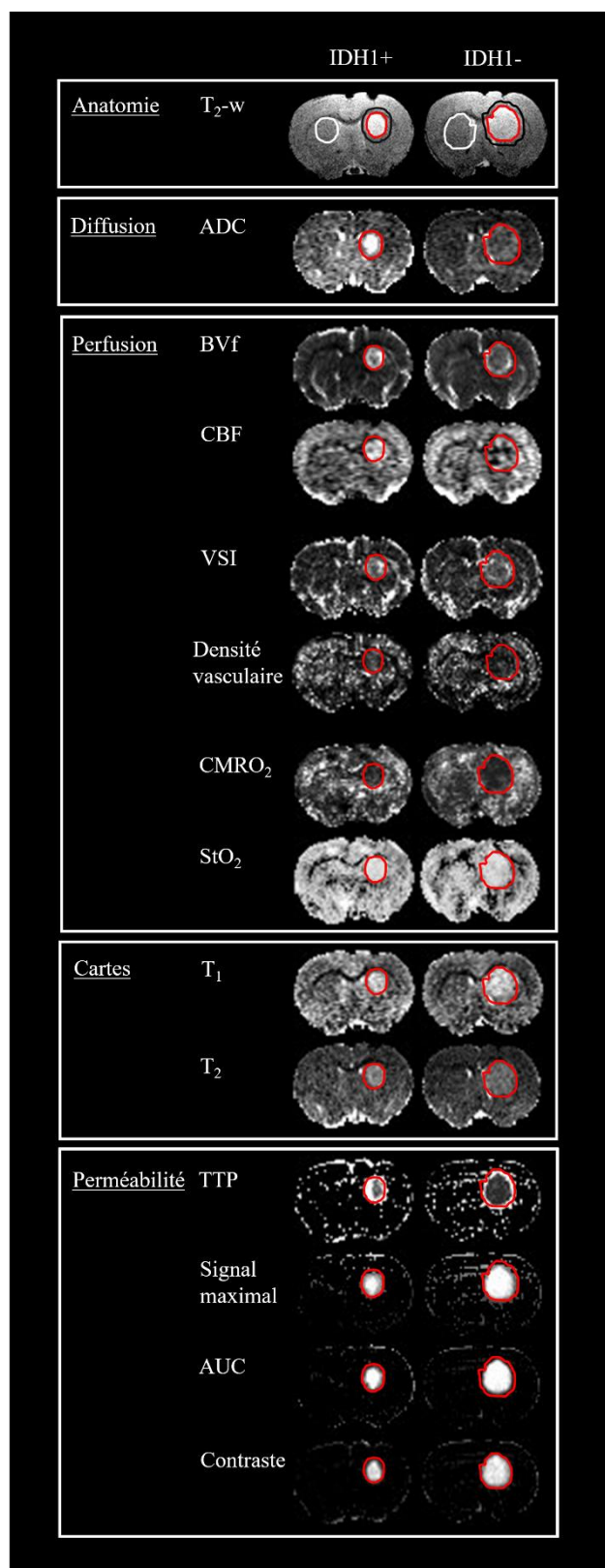


Figure 27. Cartes représentatives des paramètres IRM pour les tumeurs IDH1+ et IDH1-. Sur la carte T₂-w, le cercle rouge indique la ROI de la tumeur, le cercle blanc indique la ROI du tissu sain et le cercle noir délimite la ROI de la zone périphérique de la tumeur.

En comparaison avec les tumeurs IDH1-, les tumeurs IDH1+ ont présenté un volume tumoral plus petit ($9,63 \pm 4,11 \text{ mm}^3$ versus $18,30 \pm 5,76 \text{ mm}^3$, $p=0,01$), une meilleure diffusion ($870,08 \pm 19,54 \mu\text{m}^2/\text{s}$ versus $828,45 \pm 25,05 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p<0,01$), une valeur plus faible de la carte T_1 avec une diminution de 4,03% ($p=0,02$), une vascularisation plus dense ($223,78 \pm 20,80$ vaisseaux/ mm^2 versus $181,86 \pm 21,23$ vaisseaux/ mm^2 , $p<0,01$) et un débit sanguin CBF plus important ($145,92 \pm 29,82 \text{ mL/min/100g}$ versus $94,21 \pm 34,58 \text{ mL/min/100g}$, $p=0,02$).

Par rapport aux paramètres de la perméabilité vasculaire (**Figure 28**), les tumeurs IDH1+ ont également été caractérisées par un TTP plus long ($138,60 \pm 19,20$ secondes versus $85,95 \pm 13,96$ secondes, $p<0,01$), une valeur du signal maximal plus faible ($7,66 \pm 0,74 \text{ S.I.}$ versus $8,67 \pm 0,54 \text{ S.I.}$, $p<0,01$), une aire sous la courbe moins étendue ($32,24 \pm 7,48 \text{ S.I.}$ versus $38,12 \pm 6,14 \text{ S.I.}$, $p<0,01$), et une diminution significative du réhaussement du contraste ($68,76 \pm 14,68 \%$ versus $84,43 \pm 14,89 \%$, $p=0,04$). Cependant les valeurs de BVf, VSI, CMRO₂, StO₂ et de la carte T_2 n'ont montré aucune différence significative entre les deux types de tumeurs ($p>0,14$).

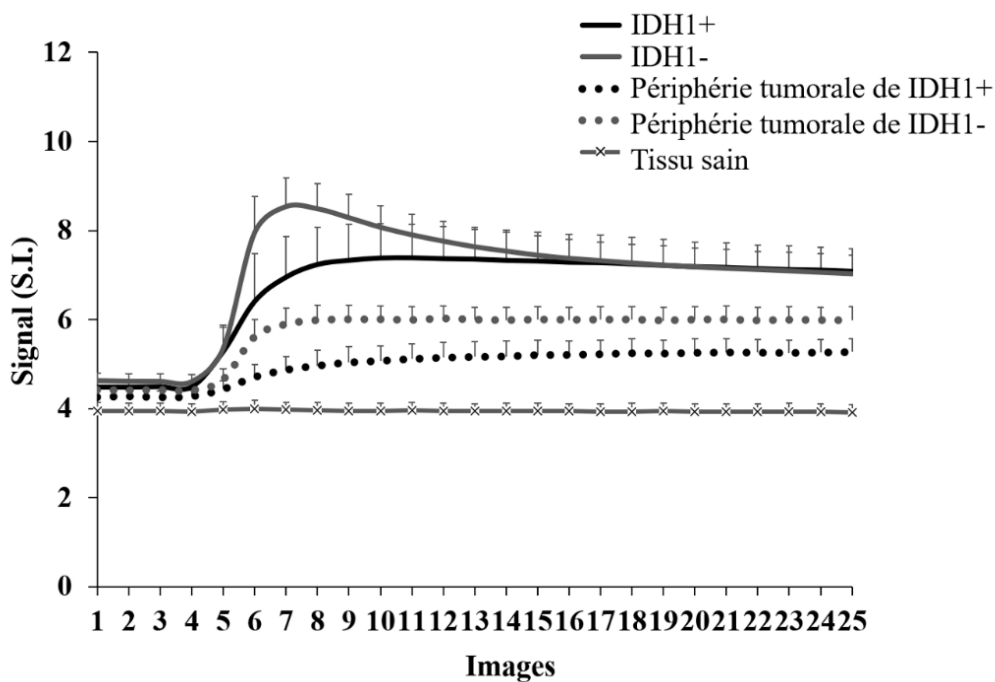


Figure 28. Courbes d'intensité du signal par l'acquisition de la séquence DCE de la tumeur IDH1+ (ligne noir) et de sa périphérie (ronds noirs), de la tumeur IDH1- (ligne grise) et de sa périphérie (ronds gris) et du tissu sain (ligne gris clair). Les valeurs ont été exprimées en moyennes $\pm$ ET pour chacun des groupes exceptés celui du tissu sain où les valeurs ont été rassemblées.

B. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LES ZONES PERIPHERIQUES TUMORALES

Les zones de périphéries tumorales ont présenté des caractéristiques similaires à celles observées dans les tumeurs IDH1+ et IDH1-. Bien que les tumeurs IDH1+ ont montré un indice de la taille des vaisseaux plus petit ($8,07 \pm 0,95 \mu\text{m}$ versus $9,34 \pm 0,67 \mu\text{m}$ pour les tumeurs IDH1-, $p=0,04$) et une diminution de la carte T_2 ($71,01 \pm 2,06$ versus $76,30 \pm 2,34$ ms pour les tumeurs IDH1-, $p<0,01$), aucune différence n'a été observée notamment pour la densité vasculaire ($p=0,24$), le CBF ($p=0,06$) et la carte T_1 ($p=0,06$) (**Tableau 3**).

C. LA COMPARAISON DES TUMEURS AVEC LE TISSU CEREBRAL SAIN

Par rapport au cerveau sain controlatéral, les deux types de tumeurs IDH1+ et IDH1- ont présenté une densité des vaisseaux significativement plus faible mais avec des valeurs d'ADC, de VSI, de StO₂, de carte T_1 et T_2 et de réhaussement du contraste plus élevées ($p<0,05$). Nous n'avons montré aucune différence pour la CMRO₂ et le TTP dans les tumeurs IDH1+ ($p>0,05$), cependant nous avons observé une diminution de ces paramètres pour les tumeurs IDH1- ($p<0,05$).

D. LES CARACTERISTIQUES DISCRIMINANTES DE LA MUTATION IDH1^{R132H} PAR IRM

D.1. L'analyse discriminante linéaire

La LDA a été réalisée pour déterminer les principales caractéristiques prédictives de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs. Deux paramètres IRM, statistiquement indépendants du volume de la tumeur ont été retenus par ce test, la densité vasculaire et le TTP. La **Figure 29** illustre la séparation des deux types de tumeurs IDH1+ et IDH1- en fonction de ces deux paramètres. En combinant ces deux paramètres dans une analyse multivariée pour l'évaluation de la performance diagnostique, nous avons obtenu une AUC de $1 \pm 0,03$ mais cette haute valeur ne reflète pas la réalité du fait de plusieurs limitations inhérentes à cette étude qui seront détaillées dans le **Chapitre VIII**.

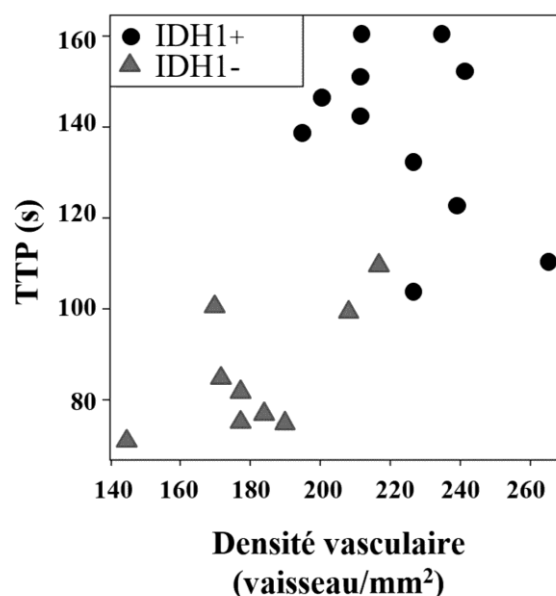


Figure 29. Test LDA représentant la séparation des tumeurs IDH1+ et IDH1- selon les deux paramètres IRM de la densité vasculaire et du TTP.

D.2. Le clustering

Une analyse par *clustering* a été réalisée afin de cartographier les voxels partageant les mêmes caractéristiques IRM selon les paramètres de la densité vasculaire et le TTP, sélectionnés par le test LDA. La distribution des différents clusters au sein des tumeurs IDH1+ et IDH1- est détaillée dans le **Tableau 4** et illustrée dans les **Figures 30 et 31**.

Tableau 4. Répartition des clusters pour la densité vasculaire et le TTP, exprimée en moyennes $\pm$ ET.

Statut IDH1	Cluster 1 (%)	Cluster 2 (%)	Cluster 3 (%)	Cluster 4 (%)	Cluster 5 (%)
IDH1+	10,63 $\pm$ 4,87	10,14 $\pm$ 4,15	25,62 $\pm$ 9,13	33,11 $\pm$ 13,01	20,50 $\pm$ 11,95
IDH1-	44,96 $\pm$ 11,57	4,50 $\pm$ 2,60	7,15 $\pm$ 3,16	12,87 $\pm$ 3,19	30,52 $\pm$ 7,21

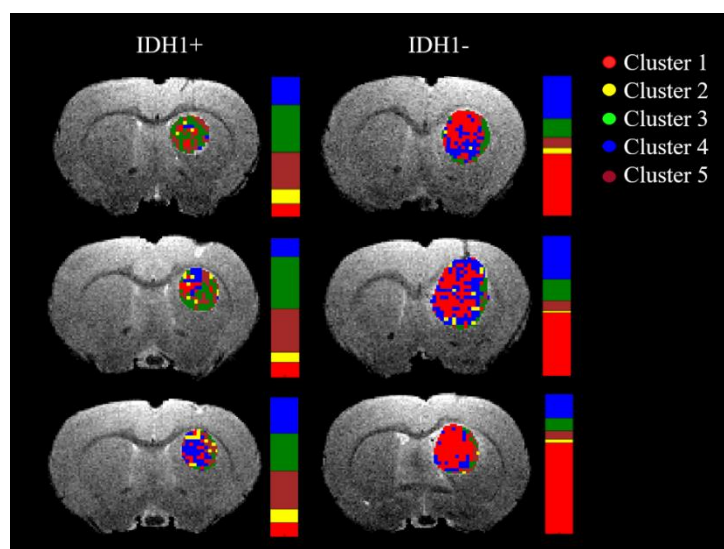


Figure 30. Aires de distribution des clusters pour la densité vasculaire et le TTP des tumeurs IDH1+ et IDH1-. Les barres représentent les proportions de chacun des clusters exprimés en pourcentage au sein de la ROI. La quantification de ces clusters est donnée dans le Tableau 4.

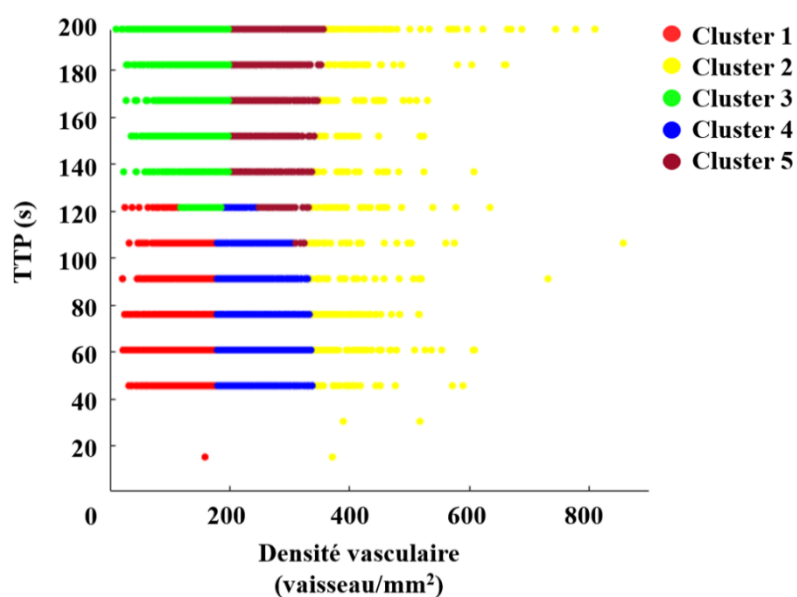


Figure 31. Représentation de la distribution de la densité vasculaire et du TTP dans chacun des 5 clusters.

E. LA CARACTERISATION DU PROFIL METABOLIQUE TUMORALE PAR SRM

Les spectres RMN des tumeurs IDH1- et IDH1+ et les résultats de la quantification des métabolites sont présentés dans le **Tableau 5** et illustrés dans la **Figure 32**.

Tableau 5. Concentrations et variations des métabolites induit par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs par SRM *in vivo*. En gras, un test de Mann-Whitney avec une significativité à $p < 0,05$.

Métabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ versus IDH1-	p
GABA	2,23±0,51	1,18±0,75	↗	0,01
GLN	5,83±0,60	4,93±1,29	=	0,14
GLU	17,07±1,16	16,79±1,29	=	0,83
GLX	22,90±1,28	21,71±2,12	=	0,21
GSH	3,03±0,27	3,40±0,47	↘	0,05
PCR	5,04±1,03	3,21±1,43	↗	0,03
TAU	8,81±1,32	6,25±1,33	↗	<0,01
M-INS	5,97±0,45	4,80±0,81	↗	0,01
tCHO	5,79±0,79	6,71±1,57	=	0,19
NAA	10,94±1,21	7,77±2,09	↗	0,01

La méthode SRM *in vivo* a montré pour les tumeurs IDH1+ des concentrations significativement plus élevées de N-acétylaspartate (NAA), de phosphocréatine (PCR), de taurine (TAU) et de myo-inositol (M-INS) et une concentration faible en glutathion (GSH) par rapport aux tumeurs IDH1- ($p < 0,05$). De même que le rapport de la choline totale (tCHO) et de NAA a également diminué de manière significative ($p = 0,04$) pour les tumeurs IDH1+. Cependant le 2-HG a été indétectable par cette méthode.

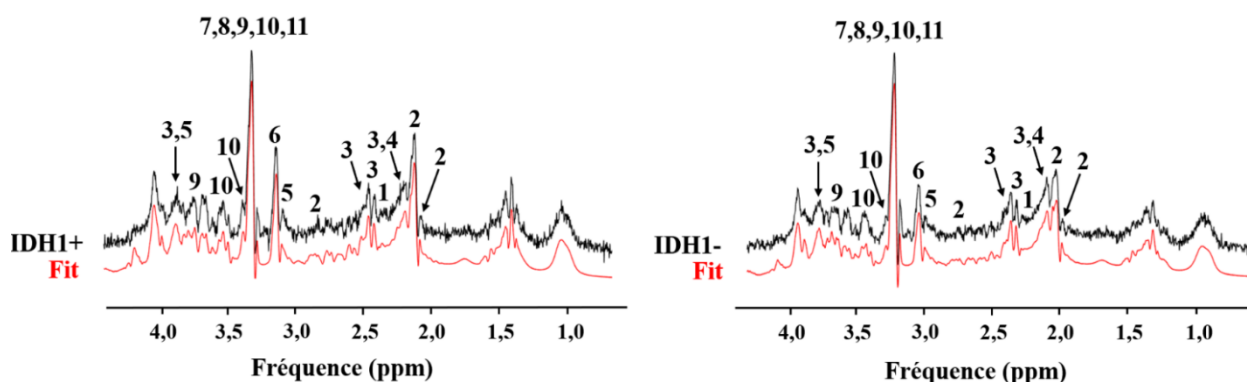


Figure 32. Représentation des spectres RMN des changements métaboliques induit par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs en SRM. Légende : 1- acide gamma-aminobutyrique, 2- N-acétylaspartate, 3- glutamate, 4- glutamine, 5- glutathion, 6- créatine+phosphocréatine, choline totale [7- choline, 8- phosphocholine, 9- glycérophosphocholine], 10- taurine, 11- myo-inositol.

IV. LA CONCLUSION

Nous avons démontré par l'étude de la caractérisation de la mutation IDH1^{R132H} par IRM multiparamétrique que son expression est associée à une densité vasculaire plus élevée et à une perméabilité plus faible dans ces tumeurs. Notre hypothèse est que le réseau vasculaire exprimant la mutation est probablement plus fonctionnel avec une meilleure perfusion, un indice de taille des vaisseaux périphériques plus faible que celui observé dans les tumeurs IDH1- se rapprochant de la vascularisation du cerveau sain. Les tumeurs IDH1+ ont également montré un profil d'agressivité plus faible en SRM avec en particulier, un rapport tCHO/NAA plus faible et une concentration en GSH plus basse.

Chapitre VI.

LA CARACTERISATION *IN VIVO* EN TEP MULTITRACEURS DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION IDH1^{R132H}

I. L'INTRODUCTION	83
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	83
A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-	83
B. LE MODELE ANIMAL.....	83
C. LES RADIOTRACEURS	84
D. LA TEP	84
D.1. La procédure expérimentale	84
D.2. Le traitement des images	85
E. L'IRM.....	86
E.1. L'acquisition et le traitement des images	86
F. LES ANALYSES STATISTIQUES	87
III. LES RESULTATS	87
A. LA POPULATION DE RATS	87
B. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR TEP.....	88
B.1. L'analyse univariée.....	88
B.1.a. Le volume tumoral	88
B.1.b. Les paramètres statiques	89
B.1.c. Les paramètres dynamiques	91
B.2. L'analyse multivariée	92
C. LE COEFFICIENT DSC	93
IV. LA CONCLUSION	94

I. L'INTRODUCTION

Le potentiel de la TEP comme outil d'imagerie complémentaire à l'IRM dans la caractérisation moléculaire des gliomes est en plein essor [50]. Les informations diagnostiques acquises avec le [^{18}F]FDG, la référence en imagerie clinique des tumeurs, sont peu adaptées aux applications en neuro-oncologie. D'autres radiotraceurs TEP ont développés, à base d'acides aminés, tels que la [^{11}C]MET, la [^{18}F]FDopa et la [^{18}F]FET se liant spécifiquement au transporteur d'acides aminés de type L-1 (LAT-1) présentent l'avantage d'une faible captation dans les tissus cérébraux sains. Ils permettent une meilleure caractérisation des gliomes [64]. Cependant la corrélation entre le statut mutationnel de l'IDH1^{R132H} et les paramètres de la TEP aux acides aminés reste encore débattue [108]. Une nouvelle génération de radiotraceurs a donc été élaborée. Parmi eux, un radiotraceur de l'angiogenèse tumorale le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ un ligand de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ qui est exprimée à la fois en surface des membranes des cellules tumorales et des cellules endothéliales néovasculaires [73–75] et un radiotraceur TEP de l'inflammation tumorale le [^{18}F]DPA-714, représentant un ligand de la protéine de translocation (TSPO) qui est également exprimée dans les cellules de gliome à la surface de la membrane mitochondriale [109, 110]. À notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent étudiée l'association des images statiques et dynamiques avec de multiples radiotraceurs pour étudier les changements métaboliques induits par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les gliomes.

II. LE MATERIEL ET LES METHODES

A. LA CULTURE DES LIGNEES U87-MG IDH1+ ET IDH1-

La méthode de culture des lignées U87-MG IDH1+ et IDH1- a été identique à celle décrite dans le **Chapitre IV paragraphe A**.

B. LE MODELE ANIMAL

La procédure de chirurgie de la greffe orthotopique chez le rat a été similaire à celle décrite dans le **Chapitre V paragraphe B**. Néanmoins, à la suite du problème des différences de volumes tumoraux entre les deux groupes IDH1+ et IDH1- dans l'étude IRM, nous avons choisi d'injecter en intracérébrale une concentration cellulaire plus élevée de l'ordre de $7,5 \times 10^4$ cellules dans 5 μL de HBSS uniquement pour le groupe IDH1+. L'ensemble de la procédure

expérimentale *in vivo* a été approuvé par le comité d'éthique lorrain N°66 (APAFIS n° 14056-2018031316365081).

C. LES RADIOTRACEURS

Les étapes de synthèses des radiopharmaceutiques du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, de la $[^{18}\text{F}]\text{FDopa}$, de la $[^{11}\text{C}]\text{MET}$, de la $[^{18}\text{F}]\text{FET}$, du $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ et du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ ont été les mêmes que celles décrites dans le **Chapitre IV paragraphe B.3**.

D. LA TEP

D.1. La procédure expérimentale

La session d'imagerie TEP des animaux a été réalisée selon un protocole de 4 jours consécutifs, en fonction de la demi-vie radioactive et de la disponibilité des radiotraceurs. Le plan expérimental a donc été le suivant : une TEP au $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ et au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ au 14^{ème} jour après la greffe orthotopique (p-g) avec un délai minimum de 5 heures entre les deux acquisitions, une IRM et une TEP à la $[^{18}\text{F}]\text{FDopa}$ au 15^{ème} jour p-g, une TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ au 16^{ème} jour p-g et une TEP au $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ au 17^{ème} jour p-g. La TEP à la $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ a été réalisée entre le 14^{ème} et le 17^{ème} jour p-g selon la disponibilité du radiotraceur. La **Figure 33** présente le plan de la procédure expérimentale.

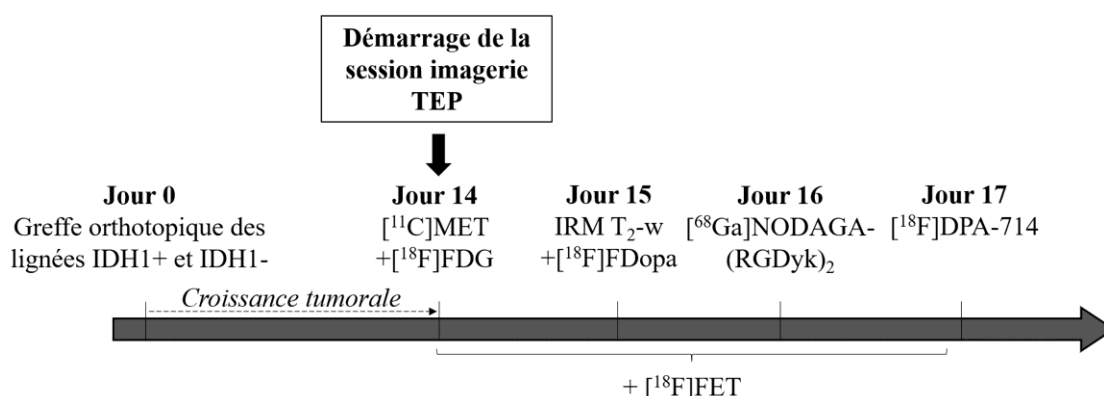


Figure 33. Organigramme du plan expérimental en imagerie TEP.

Les enregistrements TEP ont été acquis avec une caméra dédiée au petit animal (Inveon, Siemens Preclinical Solutions ®, Knoxville, USA). Deux groupes de rats ont été imagés, le

premier avec uniquement des acquisitions statiques et l'autre avec des acquisitions dynamiques et reconstruit par la suite à la fois en statique pour compléter les effectifs de la première série mais également en dynamique.

Pour les acquisitions statiques, une TEP d'une durée de 30 minutes a été réalisée au [^{18}F]FDG (74MBq) à 60 minutes après l'injection (p-i) [111], à la [^{18}F]FDopa et à la [^{18}F]FET (30MBq) à 30 minutes p-i [112], et au [^{11}C]MET (30MBq) à 20 minutes p-i, comme recommandé dans la littérature [113]. Pour les autres radiotraceurs le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ et le [^{18}F]DPA-714, une TEP d'une durée de 20 minutes a été acquise à partir de 60 minutes p-i avec une activité injectée de 30MBq [98, 114]. L'ensemble des images TEP ont été reconstruites en utilisant un algorithme 3D (OSEM3D, 4 itérations, 16 sous-ensembles, zoom 1) et une correction d'atténuation par une transmission utilisant une source de cobalt-57. La taille finale du voxel a été de $0,77 \times 0,77 \times 0,79 \text{ mm}^3$.

Les acquisitions dynamiques ont commencé quelques secondes avant l'injection du radiotraceur pour une durée de 120 minutes pour l'ensemble des radiotraceurs au fluor-18 et au gallium-68. Ensuite les données TEP acquises ont été reconstruites en statique selon le même protocole que décrit ci-dessus et en dynamique avec 27 images consécutives (5 images x 120 s, 22 images x 300 s). Pour la [^{11}C] MET, une acquisition d'une durée de 60 minutes a été réalisée pour tenir compte de la courte demi-vie du carbone-11. Les données TEP à la [^{11}C] MET ont été reconstruites sur 15 images consécutives (5 images x 120 s, 10 images x 300 s). Les paramètres de reconstruction étaient similaires à ceux des images statiques.

D.2. Le traitement des images

Une VOI a été placée sur des images statiques TEP/T $_2$ -w fusionnées sur le logiciel Inveon (Inveon Research Workplace 4.1, Siemens®, Knoxville, USA). Les VOI des tumeurs ont été créées à partir de volumes métaboliques déterminés dans la littérature : avec un facteur de 0,8 par rapport à la captation moyenne du tissu cérébral sain pour le [^{18}F]FDG, 1,3 pour les radiotraceurs à base d'acides aminés [4] et 1,8 pour le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ et le [^{18}F]DPA-714, ces derniers volumes étant issus de notre expérience. La référence cérébrale a été définie par une VOI symétrique à celle de la tumeur dans le tissu sain controlatéral.

A partir des VOI précédentes, les valeurs de captation standardisées moyenne (SUV_{mean}) et maximale (SUV_{max}) ont été déterminées. Une correction de l'effet de volume partiel (PVC) a été appliquée aux valeurs SUV_{mean} et SUV_{max} de la tumeur en utilisant les coefficients de recouvrement de contraste (RCC) *mean* et *max* correspondant au volume de chacune des

tumeurs. Pour chaque radiotracer, les RCC ont été calculés à partir d'expériences sur des fantômes utilisant des inserts sphériques de [0,031 ml ; 0,25 ml] et la détermination d'un contraste sphère/bruit de fond. Ensuite, les rapports TBR ont été calculés comme SUV_{mean} ou SUV_{max} de la captation de la tumeur divisée par le SUV_{mean} du cerveau sain (TBR_{mean} et TBR_{max}). Les VOI précédemment définies sur les images statiques, ont été replacées à l'identique sur les images dynamiques. Pour les analyses dynamiques des courbes activité-temps ont été générées, représentant l'évolution du SUV_{peak} de la tumeur en fonction du temps. Le SUV_{peak} a été utilisé comme décrit dans la littérature [62] mais adapté pour le petit animal avec une VOI tumorale de 5 mm³. Deux paramètres dynamiques ont été évalués à partir des courbes : le TTP, correspondant au délai entre le début de l'injection et l'atteinte de la valeur maximale de captation et la pente (*slope*), calculée par une régression linéaire appliquée à différents temps en fonction de la cinétique des radiotraceurs, précisément [2400 s ; 3600 s] pour les radiotraceurs à base d'acides aminés, et [1800 s ; 3000 s] pour le [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et le [¹⁸F]DPA-714.

Enfin, un coefficient de similarité (DSC) a été calculé pour chacun des rats avec des tumeurs ayant eu au moins 2 imageries TEP pour évaluer le degré de similarité des volumes métaboliques obtenus entre les différents radiotraceurs selon l'équation suivante [115] :

$$DSC = \frac{2 * |X \cap Y|}{|X| + |Y|} \quad [10]$$

Où X et Y sont l'ensemble des voxels de la segmentation des deux radiotraceurs comparés.

E. L'IRM

E.1. L'acquisition et le traitement des images

L'IRM a été réalisée sur un scanner 3T (Prisma, Siemens Healthineers®, Erlangen, Allemagne) avec une antenne volumique à 8 canaux (Rapid Biomedical GmbH®, Rimpac, Allemagne). Les images anatomiques pondérées en T₂ (T₂-w) ont été acquises à l'aide d'une séquence *Turbo Spin-Echo* (TR/TE = 2500/61 ms, taille du voxel = 255 × 255 × 1000 μm³, 24 coupes, FOV = 49 × 49 mm²) pour définir le volume de la tumeur au 15^{ème} jour après la greffe orthotopique.

Pour cela, une VOI a été placée manuellement sur les images T₂-w sur chacune des tumeurs sur le logiciel Inveon (Inveon Research Workplace 4.1, Siemens®, Knoxville, USA).

F. LES ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS (IBM, SPSS Statistics version 25.0) et R (version 3.6.1). La significativité a été fixée à $p < 0,05$ et ajustée selon la correction de Benjamini-Hochberg. Le nombre d'animaux n'étant pas suffisant pour supposer une loi de distribution normale, les variables continues ont été exprimées en médianes et quartiles. Les paramètres de la TEP et de l'IRM en analyse univariée ont été comparés avec des tests de Mann Whitney ou de Kruskal Wallis.

Pour l'analyse multivariée, une procédure d'imputation des valeurs manquantes a été réalisée en utilisant l'algorithme missForest [116]. Ensuite chaque variable a été intégrée dans un modèle de régression logistique multivariée. Les performances du modèle final ont ensuite été évaluées par une analyse de la courbe récepteur-opérateur (ROC).

III. LES RESULTATS

A. LA POPULATION DE RATS

Au total pour les images statiques en TEP, 28 tumeurs IDH1+ et 29 tumeurs IDH1- étaient disponibles *versus* 22 tumeurs IDH1+ et 21 tumeurs IDH1- pour les images dynamiques. Le **Tableau 6** détaille les imageries tumorales disponibles pour chaque radiotraceur en fonction des deux modes d'acquisitions.

Tableau 6. Récapitulatif des images de tumeurs disponibles pour chaque radiotracer en acquisitions statiques et dynamiques.

Les acquisitions statiques													
	Statut IDH	^[18F] FDG		^[18F] FDopa		^[18F] FET		^[11C] MET		^[68Ga] -(RGDyK) ₂		^[18F] DPA-714	
		IDH+	IDH-	IDH+	IDH-	IDH+	IDH-	IDH+	IDH-	IDH+	IDH-	IDH+	IDH-
^[18F] FDG	IDH+	4	-	4	-	0	-	4	-	3	-	0	-
	IDH-	-	7	-	7	-	0	-	5	-	7	-	0
^[18F] FDopa	IDH+	4	-	13	-	0	-	9	-	6	-	5	-
	IDH-	-	7	-	13	-	0	-	7	-	9	-	5
^[18F] FET	IDH+	0	-	0	-	8	-	0	-	6	-	0	-
	IDH-	-	0	-	0	-	9	-	0	-	0	-	0
^[11C] MET	IDH+	4	-	9	-	0	-	10	-	5	-	1	-
	IDH-	-	5	-	7	-	0	-	7	-	4	-	1
^[68Ga] -(RGDyK) ₂	IDH+	3	-	6	-	6	-	5	-	11	-	0	-
	IDH-	-	7	-	9	-	0	-	4	-	15	-	5
^[18F] DPA-714	IDH+	0	-	5	-	0	-	1	-	0	-	7	-
	IDH-	-	0	-	5	-	0	-	1	-	5	-	8
Les acquisitions dynamiques													
^[18F] FDopa	IDH+	0	-	8	-	0	-	5	-	1	-	5	-
	IDH-	-	0	-	6	-	0	-	2	-	4	-	5
^[18F] FET	IDH+	0	-	0	-	8	-	0	-	6	-	0	-
	IDH-	-	0	-	0	-	9	-	0	-	0	-	0
^[11C] MET	IDH+	0	-	5	-	0	-	5	-	0	-	1	-
	IDH-	-	0	-	2	-	0	-	2	-	1	-	1
^[68Ga] -(RGDyK) ₂	IDH+	0	-	1	-	6	-	0	-	11	-	5	-
	IDH-	-	0	-	4	-	0	-	1	-	15	-	0
^[18F] DPA-714	IDH+	0	-	5	-	0	-	1	-	5	-	7	-
	IDH-	-	0	-	5	-	0	-	1	-	0	-	8

B. LA CARACTERISATION TUMORALE PAR TEP

B.1. L'analyse univariée

B.1.a. Le volume tumoral

Les tumeurs IDH1+ et IDH1- ont présenté des volumes tumoraux similaires avec 23 [14,40 ; 66,25] mm³ *versus* 28 [18,00 ; 77,57] mm³ (p=0,29). Ceci contraste avec la différence de volume observée sur la série IRM mais peut s'expliquer par une chronologie de réalisation d'expérience modifiée. Nous avons réalisé les acquisitions IRM avant les acquisitions TEP et nous avons pu nous apercevoir que la lignée IDH1+ avait une vitesse de croissance tumorale *in vivo* plus lente que la lignée IDH1-. Pour la réalisation chronologique de notre plan expérimental en TEP nous avons dû augmenter la concentration cellulaire de la lignée IDH1-

greffée à l'animal pour une meilleure appréhension de cette éventuelle différence de volume entre les deux types de tumeurs.

B.1.b. Les paramètres statiques

Les résultats sont résumés dans le **Tableau 7**. Aucune différence significative entre les tumeurs IDH1+ et IDH1- n'a été observée pour les paramètres du [^{18}F]FDG et les trois radiotraceurs à base d'acides aminés avec les acquisitions statiques ($p \geq 0.26$). En revanche, et en comparaison avec les tumeurs IDH1-, les tumeurs IDH1+ ont été caractérisées par une diminution significative du TBR_{mean} (6,35 [6,06, 6,61] *versus* 7,46 [6,59, 7,84], $p=0,04$) et du TBR_{max} (7,19 [6,46, 8,00] *versus* 9,70 [8,34, 11,40], $p=0,01$) pour le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$. De plus, les tumeurs IDH1+ ont montré une tendance à un TBR_{max} plus faible pour le [^{18}F]DPA-714 (3,90 [3,2, 4,67] *versus* 5,52 [4,72, 6,72], $p=0,07$). Des illustrations des images TEP multitraceurs des tumeurs IDH1+ et IDH1- chez le rat sont présentées dans la **Figure 34**.

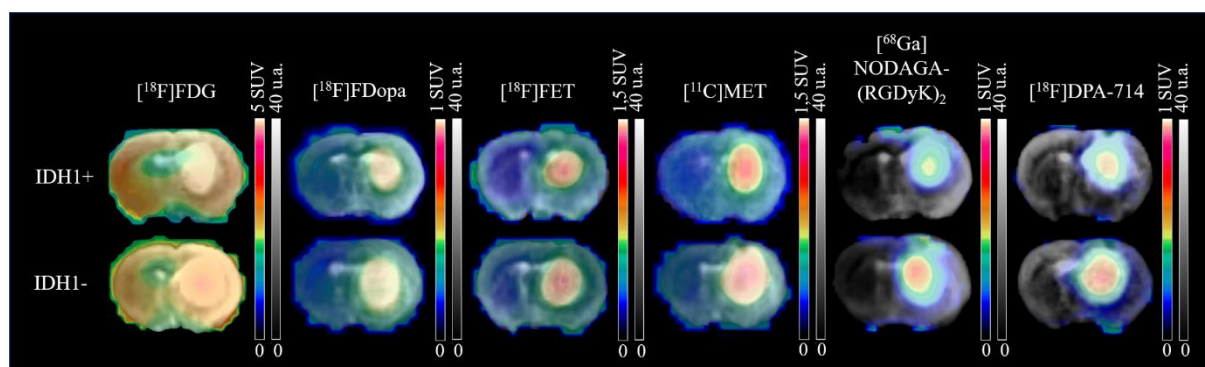


Figure 34. Images axiales représentatives de l'imagerie TEP statique fusionnées avec l'IRM T₂-w pour les tumeurs IDH1+ et IDH1-. L'IRM est exprimée en intensité du signal et la TEP en SUV.

Tableau 7. Résultats de l'analyse univariée pour les données d'IRM et de la TEP. En gras, un test de Mann Whitney avec une significativité à $p < 0,05$.

	Les acquisitions statiques								Les acquisitions dynamiques				
	Statut IDH	Effectif	TBR mean	p	TBR max	p	MTV (mm³)	p	Effectif	TTP (min)	p	Pente (SUV/h)	p
Radio-tracers [¹⁸ F] FDG	IDH1+	N=4	1.56 [1.46 ; 1.83]	0.65	1.37 [1.30 ; 1.54]	0.54	221.45 [176.60 ; 268.82]	1.00	-	-	-	-	-
	IDH1-	N=7	1.69 [1.61 ; 1.75]		1.45 [1.43 ; 1.48]		250.00 [174.15 ; 273.25]		-	-	-	-	-
[¹⁸ F] FDopa	IDH1+	N=13	2.86 [2.41 ; 3.36]	0.26	2.51 [2.07 ; 3.20]	0.26	29.00 [7.32 ; 220.70]	0.80	N=8	18.00 [17.00 ; 20.00]	0.45	-0.22 [-0.32 ; -0.17]	0.49
	IDH1-	N=13	2.57 [2.51 ; 2.95]		2.21 [2.11 ; 2.62]		72.00 [23.50 ; 202.00]		N=6	13.00 [8.00 ; 18.00]		-0.31 [-0.36 ; -0.29]	
[¹⁸ F]FET	IDH1+	N=8	2.74 [2.59 ; 2.94]	0.73	2.31 [2.24 ; 2.81]	0.96	63.35 [38.22 ; 64.27]	0.88	N=8	105.00 [60.00 ; 120.00]	0.69	-0.07 [-0.16 ; 0.09]	0.40
	IDH1-	N=9	2.70 [2.63 ; 2.96]		2.39 [2.21 ; 2.48]		53.70 [26.40 ; 68.60]		N=9	98.00 [45.00 ; 120.00]		0.02 [0.00 ; 0.29]	
[¹¹ C]MET	IDH1+	N=10	3.45 [3.12 ; 3.72]	0.69	4.22 [3.78 ; 4.67]	0.73	144.90 [19.77 ; 212.77]	0.60	N=5	-	-	-	-
	IDH1-	N=7	3.24 [3.17 ; 3.28]		3.97 [3.61 ; 4.43]		155.00 [95.25 ; 242.30]		N=2	-	-	-	-
[⁶⁸ Ga] (RGD) ₂ K ₂	IDH1+	N=11	6.35 [6.06 ; 6.61]	0.04	7.19 [6.46 ; 8.00]	0.01	79.60 [60.00 ; 151.35]	0.07	N=11	6.00 [5.00 ; 11.00]	0.31	-0.15 [-0.17 ; -0.11]	0.04
	IDH1-	N=15	7.46 [6.59 ; 7.84]		9.70 [8.34 ; 11.40]		147.80 [100.55 ; 201.75]		N=15	12.00 [7.00 ; 24.00]		0.02 [-0.02 ; 0.07]	
[¹⁸ F] DPA-714	IDH1+	N=7	4.48 [4.43 ; 4.67]	0.26	3.90 [3.29 ; 4.67]	0.07	48.50 [31.32 ; 56.60]	0.05	N=7	10.00 [7.00 ; 40.00]	0.25	-0.18 [-0.22 ; -0.16]	0.04
	IDH1-	N=8	4.86 [4.66 ; 5.16]		5.52 [4.72 ; 6.72]		76.80 [68.60 ; 113.20]		N=8	56.00 [35.00 ; 120.00]		0.23 [0.09 ; 0.29]	

B.1.c. Les paramètres dynamiques

Comme pour les paramètres statiques, les données dynamiques n'ont montré aucune significativité avec les trois radiotraceurs à base d'acides aminés ($p \geq 0.25$). En revanche, les tumeurs IDH1+ étaient associées à des pentes significativement plus décroissantes pour les radiotraceurs [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ et [^{18}F]DPA-714 (respectivement -0,15 [-0,17, -0,11] versus 0,02 [-0,02, 0,07], $p=0,04$ et -0,18 [-0,22, -0,16] versus 0,23 [0,09, 0,29], $p=0,04$). En raison des résultats négatifs obtenus à la fois en *in vitro* et en *in vivo* avec les données statiques, nous avons choisi de ne pas enregistrer les images dynamiques au [^{18}F]FDG. De même, nous n'avons pas pu analyser les paramètres dynamiques pour la [^{11}C]MET en raison du manque d'effectif des groupes d'animaux avec seulement 5 tumeurs IDH1+ et 2 tumeurs IDH1- lié à une panne de la ciblerie carbone-11 apparue en cours d'expérience. Les courbes dynamiques moyennes de chaque radiotraceur sont illustrées dans la **Figure 35**.

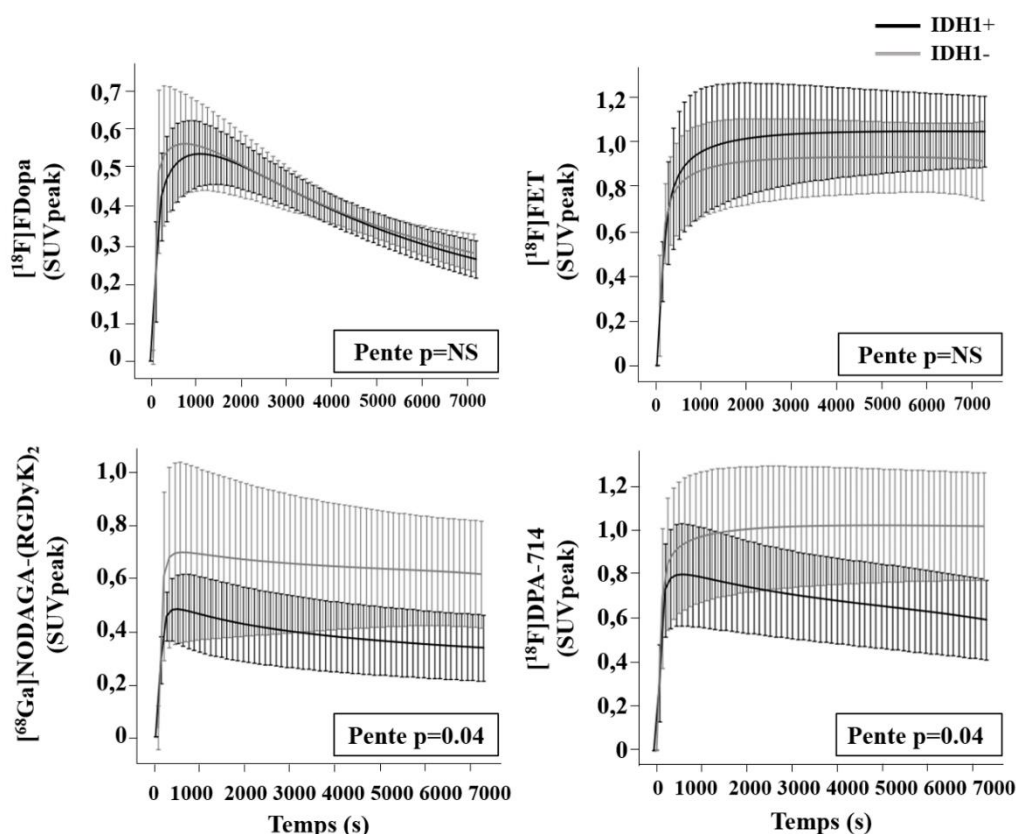


Figure 35. Courbes activité-temps représentant l'évolution de la moyenne $\pm$ ET du SUVpeak des tumeurs IDH1+ et IDH1-. Un test de Mann Whitney a été réalisé avec une significativité à $p < 0,05$.

B.2. L'analyse multivariée

Les résultats de cette analyse multivariée sont dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Résultats de l'analyse multivariée pour l'IRM et la TEP, après sélection des paramètres de l'analyse univariée présentant une valeur $p < 0,2$. En gras, une régression logistique multivariée avec une significativité à $p < 0,05$.

Paramètres	Radiotraceurs	Coefficient	p
Volume IRM	-	-	0,97
TBRmean	[¹⁸ F]FDG	-	0,86
	[¹⁸ F]FDopa	-	0,86
	[¹⁸ F]FET	-	0,46
	[¹¹ C]MET	-	0,49
	[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂	-	0,99
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0,71
TBRmax	[¹⁸ F]FDG	-	0,77
	[¹⁸ F]FDopa	-	0,62
	[¹⁸ F]FET	-	0,13
	[¹¹ C]MET	-	0,32
	[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂	-0,41	0,01
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0,48
MTV	[¹⁸ F]FDG	-	0,19
	[¹⁸ F]FDopa	-	0,65
	[¹⁸ F]FET	-	0,65
	[¹¹ C]MET	-	0,80
	[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂	-	0,78
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0,98
TTP	[¹⁸ F]FDopa	-	0,83
	[¹⁸ F]FET	-	0,98
	[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂	-	0,74
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0,99
Pente	[¹⁸ F]FDopa	-	0,44
	[¹⁸ F]FET	-	0,47
	[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂	-8,54	0,02
	[¹⁸ F]DPA-714	-8,70	<0,01

L'analyse multivariée a montré que la combinaison du TBR_{max} et de la pente du $[^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)_2$ à la pente du $[^{18}F]DPA-714$ ont obtenu les meilleures performances diagnostiques pour distinguer les deux types de tumeurs (AUC de $0,81 \pm 0,05$ $p < 0,01$). La courbe ROC est présentée dans la **Figure 36**.

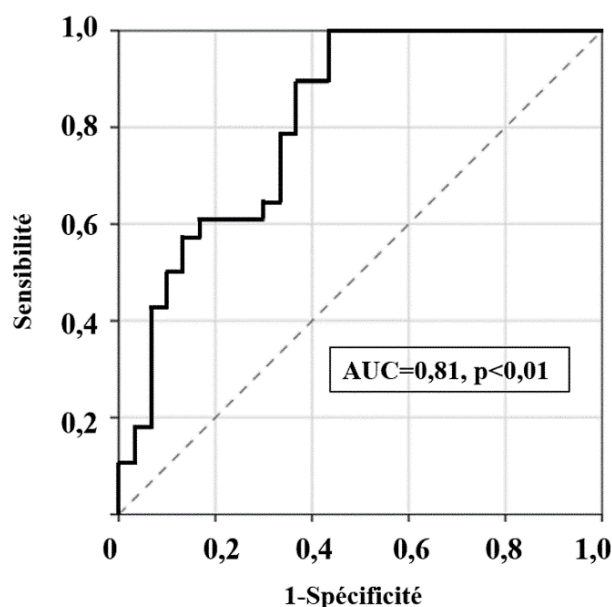


Figure 36. Représentation ROC de la combinaison du TBR_{max} et de la pente du $[^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)_2$ et de la pente du $[^{18}F]DPA-714$ pour discriminer les tumeurs IDH1+ et IDH1-.

C. LE COEFFICIENT DSC

L'ensemble des résultats exploitables des coefficients DSC ($N \geq 5$ tumeurs pour une comparaison entre deux radiotraceurs) sont présentés dans le **Tableau 9**. Toutes les médianes des indices DSC ont été $\geq 0,70$ pour toutes les comparaisons entre les radiotraceurs, à l'exception de l'indice DSC entre la $[^{18}F]FDopa$ et le $[^{18}F]DPA-714$ ($0,38 [0,26, 0,55]$).

Tableau 9. Résultats du coefficient de similarité DSC entre les MTV des différents radiotraceurs TEP. Seuls les groupes avec un N>5 ont été comparé.

La comparaison des radiotraceurs	Effectif	Indice DSC
[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂ ; [¹⁸ F]FDopa	N= 13	0,71 [0,39 ; 0,76]
[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂ ; [¹¹ C]MET	N= 8	0,76 [0,72 ; 0,80]
[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂ ; [¹⁸ F]DPA-714	N= 6	0,73 [0,73 ; 0,76]
[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂ ; [¹⁸ F]FET	N= 5	0,69 [0,69 ; 0,70]
[⁶⁸ Ga]-(RGDyK) ₂ ; [¹⁸ F]FDG	N= 10	0,73 [0,68 ; 0,81]
[¹⁸ F]FDopa ; [¹¹ C]MET	N=16	0,74 [0,65 ; 0,80]
[¹⁸ F]FDopa ; [¹⁸ F]DPA-714	N=9	0,38 [0,26 ; 0,55]
[¹⁸ F]FDopa ; [¹⁸ F]FDG	N= 9	0,73 [0,63 ; 0,80]
[¹¹ C]MET ; [¹⁸ F]FDG	N=7	0,70 [0,69 ; 0,79]

IV. LA CONCLUSION

Dans cette étude TEP multitraceurs multiparamétrique, nous avons démontré que la mutation IDH1^{R132H} est associée à une plus faible captation des radiotraceurs [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et [¹⁸F]DPA-714 en *in vivo*. De plus par l'analyse multivariée avec la combinaison du TBR_{max} et de la pente du [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et de la pente du [¹⁸F]DPA-714, nous avons montré de bonnes performances diagnostiques pour la discrimination de la mutation IDH1^{R132H}. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues *in vitro*, ayant montré une captation significativement plus faible de [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et de [¹⁸F]DPA-714 dans les tumeurs IDH1+. Par ailleurs, nous n'avons obtenu aucune différence significative entre les tumeurs IDH1+ et IDH1- pour le [¹⁸F]FDG et les trois traceurs d'acides aminés, ce qui était également en accord avec ce qui avait été observé *in vitro*.

Chapitre VII.

LA CARACTERISATION *EX VIVO* EN HR-MAS ET EN HISTOLOGIE DE TUMEURS DERIVEES DE GHG HUMAIN EXPRIMANT LA MUTATION **IDH1^{R132H}**

I. L'INTRODUCTION	96
II. LE MATERIEL ET LES METHODES	96
A. LA HR-MAS	96
A.1. L'acquisition.....	96
A.2. Le traitement des spectres HR-MAS	96
B. L'HISTOLOGIE	97
B.1. Les marquages	97
B.2. Le traitement des images	97
C. L'ANALYSE STATISTIQUE	97
III. LES RESULTATS	98
A. LA CARACTERISATION Tumorale EN HR-MAS	98
B. LA CARACTERISATION Tumorale EN IMMUNO-HISTOPATHOLOGIE	99
B.1. L'expression de la mutation IDH1 ^{R132H}	99
B.2. La prolifération	100
B.3. L'angiogenèse.....	100
B.4. Les récepteurs et les transporteurs	101
IV. LA CONCLUSION	102

I. L'INTRODUCTION

En fin de session d'imagerie IRM et TEP, certains animaux sous anesthésie ont été sacrifiés par décapitation. Nous avons ensuite prélevé des échantillons de tumeurs que nous avons utilisés pour les acquisitions HR-MAS et pour les analyses histologiques afin de caractériser les tumeurs IDH1+ et IDH1- *ex vivo*.

II. LE MATERIEL ET LES METHODES

A. LA HR-MAS

A.1. L'acquisition

Les échantillons de tumeurs (N=8 IDH1+ et N=7 IDH1-) ont été ajoutés dans une sonde froide de 4 mm (1H-13C-31P) avec 30 μ L d'oxyde de deutérium (D₂O) [117]. L'ensemble des spectres HR-MAS ont été enregistrés avec une fréquence protonique de 400 Hz (spectromètre Bruker Avance III 500) et une séquence d'impulsions Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) synchronisée avec la vitesse de rotation pour atténuer les résonances des macromolécules et des lipides. L'acquisition totale d'un seul spectre a été d'une durée de 17 min.

A.2. Le traitement des spectres HR-MAS

La quantification a été effectuée en utilisant une estimation quantique QUEST incluse dans le logiciel jMRUI. Nous avons utilisé la base de métabolites suivante : le lactate (LAC), l'alanine (ALA), l'acide- γ -aminobutyrique (GABA), le N-acétylaspartate (NAA), le glutamate (GLU), la glutamine (GLN), le glutathion (GSH), l'aspartate (ASP), la créatine (Cr), la phosphocréatine (PCr), la phosphocholine (PCh), la glycérophosphocholine (GPC), la taurine (TAU), l'inositol (INS) et la glycine (GLC), acétate (ACE), hypotaurine (HYPO), phosphoéthanolamine (PE), choline (Cho), bétaine (BETAINE), succinate (SUC), valine (VAL) et β -hydroxybutyrate (β -OH). L'amplitude des métabolites calculée par QUEST a été normalisée par rapport au signal total du spectre et la fiabilité de la quantification a été évaluée en utilisant les bornes de Cramer Rao (CRLB) déterminées par l'algorithme de jMRUI, avec l'inclusion de toutes les valeurs $\leq$ 15%.

B. L'HISTOLOGIE

B.1. Les marquages

Les échantillons de tumeurs ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % et inclus en paraffine. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de paraffine de 5 µm après avoir été immergées dans un tampon de citrate de sodium 10 mM (pH 6) pendant 20 minutes à 97°C pour le déparaffinage et la révélation des antigènes. Ensuite nous avons utilisés les anticorps primaires suivants : un anti-IDH1^{R132H} (1:70, DIA-H09, Dianova), un Ki-67 (1:200, MIB1, Dako), un anti-GLUT-1 (1:600, NB-22-3291, Neo Biotech), un anti-CD-98 (1:500, LS-C4853000, LSBio), un anti-αvβ3 (1:250, LS-C15964, LSBio) et un anti-TSPO (anti- (1:500, 119-13538, RayBiotech). L'ensemble des marquages a été fait dans un automate Dako Autostainer Plus ® avec un révélateur Flex+ (Dako) [118] excepté pour l'anti-CD-31(1:250, Abcam, [EPR17259] ab182981, Paris, France) pour lequel un marquage manuel a été nécessaire avec l'utilisation d'un kit de détection HRP/DAB (Abcam, ab64261, Paris, France).

B.2. Le traitement des images

L'ensemble des coupes a été examiné par un médecin neuropathologiste (C.P.) et moi-même (A.C.) avec un microscope Olympus BX 51. L'analyse quantitative a ensuite été réalisée avec le logiciel Image J (version 1.48) comme détaillé dans le paragraphe suivant.

L'expression de la mutation IDH1^{R132H} a été évaluée de manière binaire avec un marquage soit positif, soit négatif. L'indice du Ki-67 a été défini comme étant le rapport du nombre de cellules présentant une coloration nucléaire sur le nombre total de cellules au grossissement x40 et sur trois champs différents. Cet indice a été exprimé en pourcentage. Les sections vasculaires révélées par l'anti-CD-31 et l'anti-αvβ3 ont été comptées et moyennées sur trois champs consécutifs au grossissement x20 et ont été exprimés en nombre total moyen de vaisseaux par mm². Le marquage de GLUT-1 a été déterminé sur un seul champ au grossissement x40. Enfin, un score a été réalisé pour TSPO et CD-98 selon l'intensité du marquage avec : 0 = absence de marquage, 1 = marquage léger, 2 = marquage modéré ou fort < 50 % des cellules, 3 = marquage fort > 50 % des cellules.

C. L'ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel SPSS (IBM®, SPSS Statistics version 25.0). Les marquages immuno-histochimiques ont été comparés avec un test de Mann Whitney avec

une valeur de significativité à $p < 0,05$. Les variables ont été exprimées en moyennes $\pm$ ET (mutation IDH1^{R132H}, CD-31, prolifération KI-67 et quantification HR-MAS) ou en médianes et quartiles (GLUT-1, CD-98, $\alpha\text{v}\beta 3$ et TSPO).

III. LES RESULTATS

A. LA CARACTERISATION TUMORALE EN HR-MAS

Les spectres MR des tumeurs IDH1+ et IDH1- et les résultats de la quantification des métabolites sont détaillés dans le **Tableau 10** et dans la **Figure 37**.

Tableau 10. Concentrations et variations des métabolites induit par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs en HR-MAS ex vivo. En gras, un test de Mann-Whitney avec une significativité à $p < 0,05$.

Métabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ versus IDH1-	p
GABA	5,17E-03 $\pm 1,25\text{E-}03$	3,91E-03 $\pm 1,26\text{E-}03$	=	0,22
GLN	1,12E-02 $\pm 2,21\text{E-}03$	1,01E-02 $\pm 3,55\text{E-}03$	=	0,49
GLU	3,37E-02 $\pm 1,84\text{E-}03$	4,75E-02 $\pm 4,24\text{E-}03$	$\searrow$	<0,01
GLX	4,49E-02 $\pm 4,45\text{E-}03$	5,76E-02 $\pm 5,17\text{E-}03$	$\searrow$	<0,01
GSH	5,82E-03 $\pm 5,78\text{E-}04$	8,94E-03 $\pm 1,02\text{E-}03$	$\searrow$	<0,01
PCR	1,73E-02 $\pm 3,46\text{E-}03$	1,03E-02 $\pm 3,90\text{E-}03$	$\nearrow$	0,03
TAU	2,37E-02 $\pm 3,66\text{E-}03$	1,78E-02 $\pm 3,02\text{E-}03$	$\nearrow$	0,03
M-INS	1,73E-02 $\pm 2,51\text{E-}03$	1,35E-02 $\pm 6,11\text{E-}04$	$\nearrow$	0,02
tCHO	2,82E-02 $\pm 7,47\text{E-}03$	2,27E-02 $\pm 6,90\text{E-}03$	=	0,20
NAA	1,00E-02 $\pm 4,45\text{E-}03$	3,91E-03 $\pm 3,75\text{E-}03$	$\nearrow$	0,05
tCHO/NAA	21,91 $\pm 17,34$	3,62 $\pm 2,80$	=	0,13

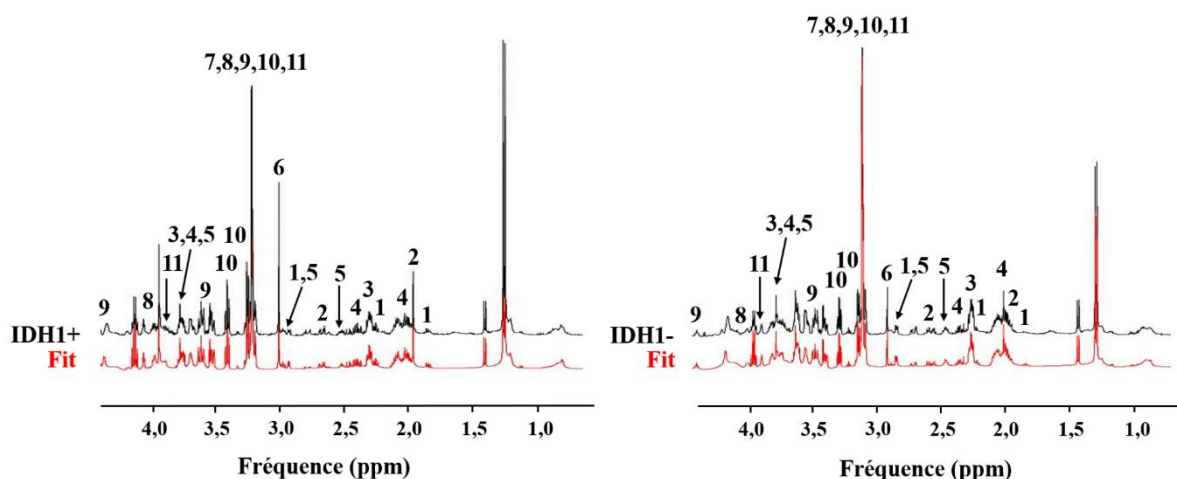


Figure 37. Représentation des spectres RMN des changements métaboliques induit par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs en HR-MAS. Légende : 1- acide gamma-aminobutyrique, 2- N-acétylaspartate, 3- glutamate, 4- glutamine, 5- glutathion, 6- créatine+phosphocréatine, choline totale [7-choline, 8- phosphocholine, 9- glycérophosphocholine], 10- taurine, 11- myo-inositol.

Les résultats HR-MAS obtenus sont cohérents avec la MRS *in vivo*. En effet, les deux méthodes ont globalement présenté les mêmes variations de métabolites pour les tumeurs IDH1+ comme décrit dans le **Chapitre V paragraphe E.** avec notamment des concentrations significativement plus élevées de NAA, de PCR, de TAU, de M-INS et une concentration plus faible en GSH par rapport aux tumeurs IDH1- ($p < 0,03$). De même, le 2-HG a également été indétectable par cette méthode. En revanche, contrairement à la MRS, le GLU a été retrouvé diminué de manière significative dans les tumeurs IDH1+ ($p < 0,01$)

B. LA CARACTERISATION TUMORALE EN IMMUNO-HISTOPATHOLOGIE

B.1. L'expression de la mutation IDH1^{R132H}

Nous avons confirmé *ex vivo* l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans la lignée tumorale IDH1+ par l'immunomarquage de l'anti-IDH1^{R132H} visible dans la **Figure 38**

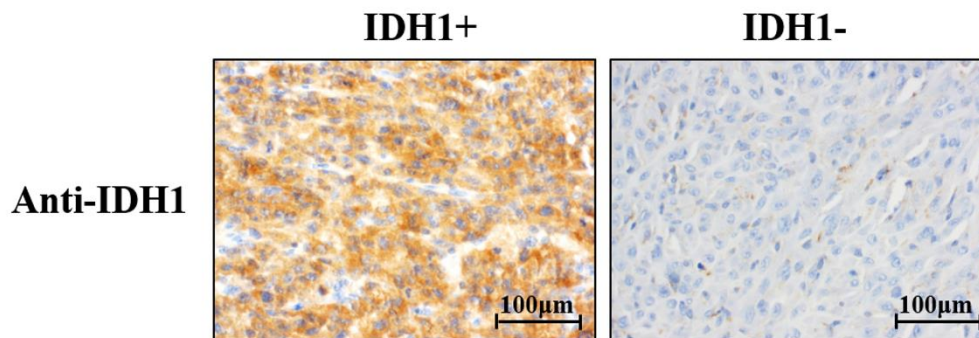


Figure 38. Coupes immuno-histochimiques du marquage de l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs IDH1+ et IDH1- avec un anticorps anti-IDH1^{R132H}. Grossissements x40.

B.2. La prolifération

Concernant la prolifération cellulaire (Ki-67), nous n'avons trouvé aucune différence entre les tumeurs IDH1+ (N=4) et IDH1- (N=4) avec respectivement $54,47 \pm 14,93$ % et $54,05 \pm 2,92$ % ($p=0,58$). Par rapport au tissu sain controlatéral avec un Ki-67 <1%, les deux types de tumeurs IDH1+ et IDH1- ont présenté une prolifération cellulaire plus importante ($p<0,01$). Des images représentatives du marquage Ki-67 sont illustrées dans la **Figure 39**.

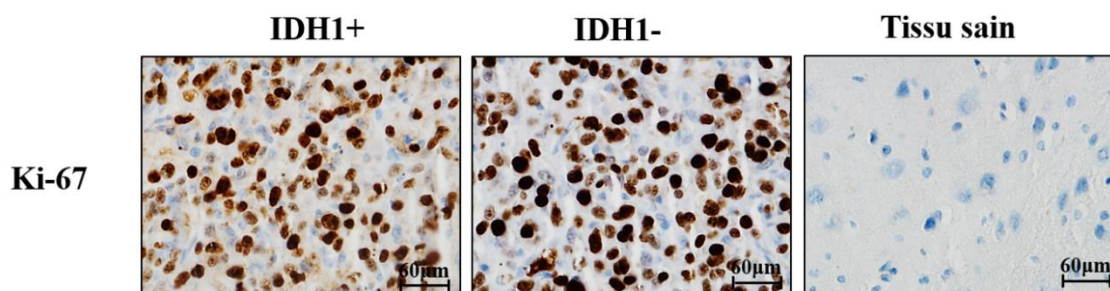


Figure 39. Coupes immuno-histochimiques du marquage de la prolifération Ki-67 des tumeurs IDH1+, IDH1- et du tissu cérébral sain. Grossissement x40.

B.3. L'angiogenèse

Contrairement aux résultats *in vivo*, nous n'avons trouvé aucune différence de densité vasculaire (anti-CD-31) pour les tumeurs IDH1+ (N=4) *versus* IDH1- (N=4) ($220,00 \pm 38,10$ vaisseau/mm² *versus* $188,33 \pm 13,74$ vaisseau/mm², $p=0,38$). Cependant en comparaison au tissu sain controlatéral, les deux types de tumeurs IDH1+ et IDH1- ont présenté une densité

vasculaire plus faible avec $390,00 \pm 85,00$ vaisseaux/ mm^2 pour le tissu sain ($p < 0,01$). Des images représentatives du marquage CD-31 sont illustrées à la **Figure 40**.

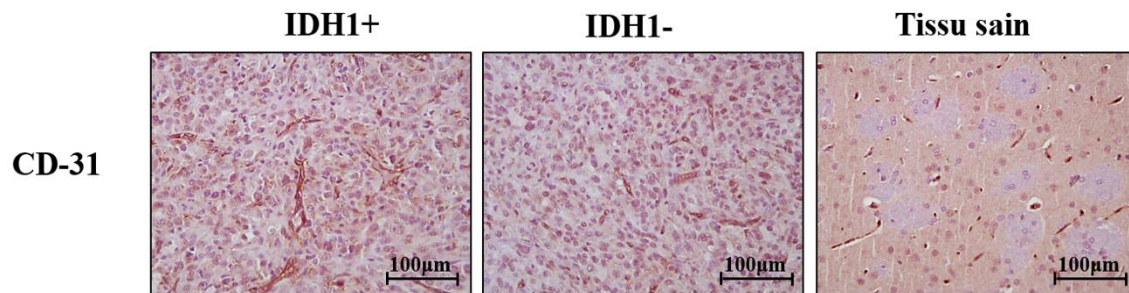


Figure 40. Coupes immuno-histochimiques du marquage CD-31 des tumeurs IDH1+, IDH1- et du tissu cérébral sain. Grossissement x40.

Nous avons trouvé le même résultat pour l'immuno-marquage de l'intégrine $\alpha\beta3$ avec aucune différence notable entre les deux types de tumeurs avec un nombre médian de sections vasculaires égal à 22,50 [15,75 ; 22,50] pour IDH1+ (N=8) et 19,50 [14,50 ; 22,25] pour IDH1- (N=8) ($p=0,44$). Des images représentatives du marquage $\alpha\beta3$ sont illustrées à la **Figure 41**.

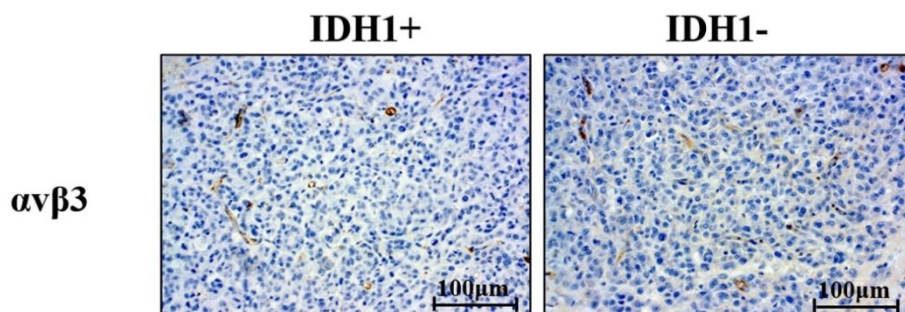


Figure 41. Coupes immuno-histochimiques du marquage $\alpha\beta3$ des tumeurs IDH1+ et IDH1-. Grossissement x40.

B.4. Les récepteurs et les transporteurs

De manière intéressante, nous avons obtenu des résultats conformes aux analyses TEP pour la quantification immuno-histochimique des récepteurs GLUT-1 et du transporteur LAT-1. En effet, aucune différence significative n'a été observé pour le marquage de GLUT-1 avec une valeur médiane de 28,00 [18,00 ; 38,00] pour IDH1+ (N=9) et 32,00 [26,75 ; 35,75] pour IDH1-

(N=10) (p=0,54) et un score moyen de 2 pour le marquage de LAT-1 (CD-98) pour les deux types de tumeurs (N=7 IDH1+ et N=11 IDH1-) (p=0,55)

Cependant de manière contradictoire avec les données *in vivo*, l'évaluation des récepteurs TSPO n'a montré aucune différence avec un score moyen de 1 pour les deux tumeurs IDH1+ et IDH1- (N=10 IDH1+ et N=13 IDH1-, p=0,63) (**Figure 42**).

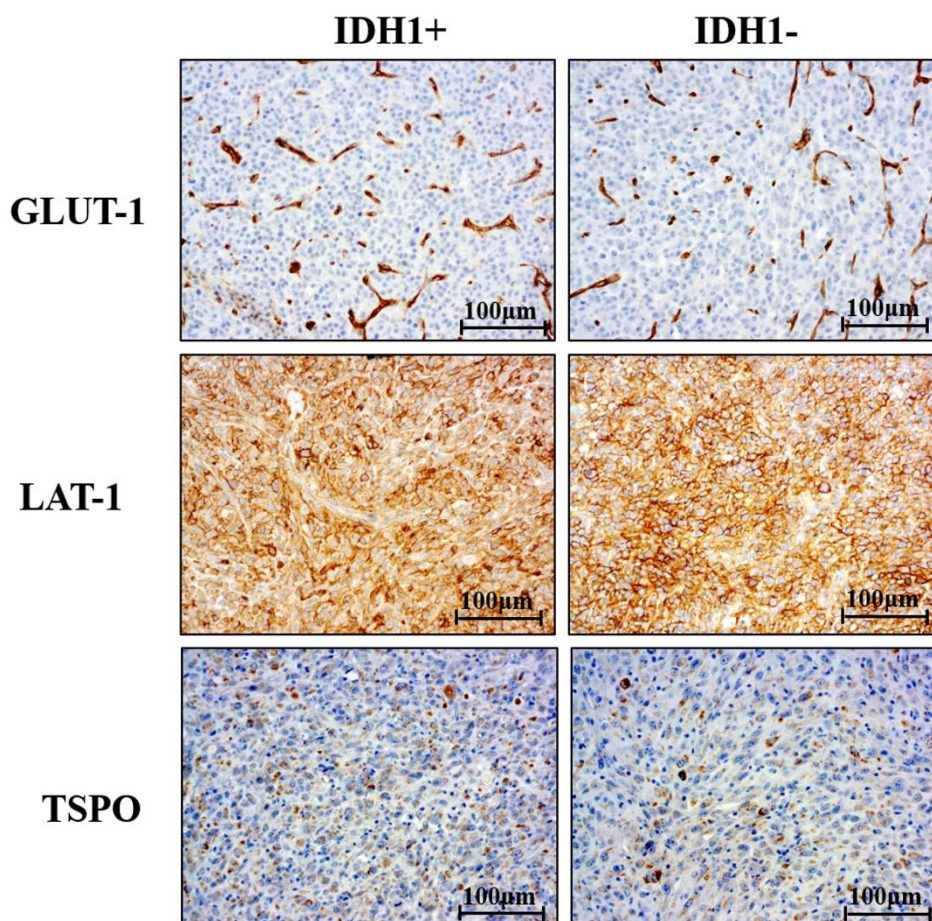


Figure 42. Coupes immuno-histochimiques des récepteurs GLUT-1 et TSPO et du transporteur LAT-1 des tumeurs IDH1+ et IDH1-. Grossissement x20.

IV. LA CONCLUSION

Par l'analyse *ex vivo* nous avons validé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs IDH1+. L'étude HR-MAS a confirmé nos résultats prometteurs en spectroscopie *in vivo* avec un profil de métabolites moins agressif observé dans les cellules IDH1+. Nous avons également confirmé nos résultats de TEP pour l'expression de GLUT-1 et de LAT-1 (CD-98) sans

différence d'expression entre les tumeurs IDH1+ et IDH1-. Cependant, en contradiction avec les données obtenues en *in vitro* et en *in vivo*, aucun autre marquage ne révèle de différence significative pour l'angiogenèse (CD-31 et $\alpha\text{v}\beta 3$) et pour le récepteur TSPO entre les deux tumeurs IDH1+ et IDH1-.

Chapitre VIII.

LA DISCUSSION

I. LA CARACTERISATION TUMORALE.....	105
A. IN VITRO	105
B. L'IMAGERIE <i>IN VIVO</i>	105
B.1. Par IRM	105
B.2. Par TEP	107
C. EX VIVO.....	108
II. LES LIMITATIONS	109

I. LA CARACTERISATION TUMORALE

A. IN VITRO

Dans l'étude *in vitro*, nous avons mis en évidence deux radiotraceurs d'intérêt. Le premier est le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$. Nous l'avons analysé afin d'évaluer l'effet de la mutation IDH1^{R132H} sur la voie de l'angiogenèse tumorale par l'intermédiaire de l'expression des intégrines $\alpha\beta 3$. En effet, ce radiotraceur a la capacité de se lier à la fois aux cellules endothéliales néo-vasculaires et à la surface des cellules tumorales [77]. Le second radiotraceur d'intérêt est le [^{18}F]DPA-714. Ce radiotraceur cible les récepteurs TSPO des membranes mitochondriales et qui sont surexprimés lors de la neuro-inflammation tumorale. Pour chacun des deux radiotraceurs, nous avons observé une faible captation des cellules IDH1+. En *in vitro*, l'absence du micro-environnement extracellulaire tumorale nous permet de supposer que ces résultats reflètent une baisse de l'expression des intégrines $\alpha\beta 3$ et des récepteurs TSPO par ces cellules. Il a été reconnu dans la littérature que les intégrines $\alpha\beta 3$ et les récepteurs TSPO représentent des marqueurs biologiques d'agressivité dans les voies de l'angiogenèse et de l'inflammation tumorale [119–124]. Dans cette expérience *in vitro*, leurs faibles niveaux d'expression cellulaire mettent en évidence un profil tumoral moins agressif dans les tumeurs exprimant la mutation IDH1^{R132H}.

B. L'IMAGERIE IN VIVO

B.1. Par IRM

Dans cette étude *in vivo* par IRM multiparamétrique, nous avons mis en évidence deux paramètres d'importance dans la discrimination de la mutation IDH1^{R132H} représenté par la densité vasculaire et le TTP. Après une revue de la littérature, nous n'avons trouvé que peu d'articles précliniques *in vivo* évaluant l'effet de la mutation IDH1^{R132H} par IRM. Les deux études en lien avec notre sujet concernaient une surexpression, et non une expression de la mutation IDH1^{R132H} comme dans notre étude, et aucune n'a étudié le paramètre de la densité vasculaire [60, 125]. D'après nos résultats, les tumeurs IDH1+ ont présenté une densité vasculaire plus élevée, ce qui reste néanmoins en cohérence avec une étude en IRM clinique dans laquelle les auteurs ont rapporté une valeur de l'indice des micro-vaisseaux (MTI) significativement plus haute dans des gliomes de haut grade exprimant la mutation IDH1^{R132H} [126].

Dans notre démarche de l'évaluation d'autres paramètres de la néo-angiogenèse tumorale, nous avons également enregistré une séquence DCE. Cette séquence représente une approche semi-quantitative, permettant d'apprécier l'état de la perméabilité vasculaire par l'injection de gadolinium. Par cette méthode nous avons montré une vascularisation moins perméable des tumeurs IDH1+, avec en particulier un TTP plus long et un faible contraste dans ces tumeurs. En accord avec nos résultats, l'équipe de Lazovic *et al.*, a également mis en évidence des vaisseaux moins perméables associé à des zones de rehaussement du contraste moins importantes dans des tumeurs IDH1^{R132H} mutantes [60]. Et c'est à partir de la même méthode DCE-IRM appliquée en clinique, que Lu *et al* a décrit un TTP plus long pour les gliomes IDH1+ [127]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les tumeurs IDH1+ peuvent être caractérisées par une vascularisation dense mais associée à une faible perméabilité, suggérant une meilleure fonctionnalité du réseau vasculaire se rapprochant davantage des critères d'une vascularisation d'un tissu sain.

Nous avons intégré au protocole d'IRM multiparamétrique une séquence de spectroscopie *in vivo* afin d'établir un spectre d'expression en métabolites induit par la présence de la mutation IDH1^{R132H} dans nos tumeurs. Nous souhaitions dans un premier temps valider le modèle de tumeur U87-MG exprimant la mutation par la quantification du spectre du 2-HG, cependant ce spectre a été impossible à détecter. La raison à cette absence de pic est probablement due à la faible concentration en 2-HG mesurée dans nos tumeurs IDH1+ (0,09 mM), par rapport à ce que nous pouvons retrouver dans les gliomes humains où le 2-HG est considérablement plus élevé (2-9 mM) [61]. Nous pouvons supposer également, que le chevauchement de pics de résonance des spectres proches du 2-HG telles que le NAA ou le GLU peut rendre sa quantification difficile dans un champ magnétique à 4,7T comme utilisé dans notre expérience [58]. Pour pallier aux biais de la quantification du 2-HG, des études récentes ont proposé de quantifier d'autres métabolites pour déterminer l'expression de la mutation IDH1^{R132H} [57, 59]. Bien que tous les métabolites n'aient pas pu être détectés en raison du faible champ magnétique de l'IRM, nos résultats sont conformes à la littérature et valident les variations en métabolites spécifiques et connus à l'expression de la mutation IDH1^{R132H} [57, 59, 128, 129]. Notamment, les tumeurs IDH1+ ont montré des concentrations plus élevées en NAA, TAU, PCR, M-INS et une baisse du rapport tCHO/NAA, considérés comme des biomarqueurs de non agressivité [130–134]. Dans cette expérience de spectroscopie, nous avons présenté des profils en métabolites considérés comme moins agressifs dans les tumeurs exprimant la mutation IDH1^{R132H} corroborant les résultats précédents.

B.2. Par TEP

Notre analyse TEP multitraceurs multiparamétrique a permis de mettre en évidence l'intérêt des deux radiotraceurs $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ et $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$. En effet, leur utilisation en TEP apporte des informations diagnostiques indépendantes, démontrant l'intérêt d'une approche multitraceurs mais montre également de bonnes performances diagnostiques dans le cas de la combinaison des paramètres statiques et dynamiques, démontrant l'intérêt d'une approche multiparamétrique.

Comme pour l'expérience *in vitro*, nous avons retrouvé une baisse significative de la captation du $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ par les tumeurs IDH1+ évalué par le TBR_{max} des paramètres statiques, associé à une pente plus décroissante déterminée à partir des données dynamiques. L'ensemble de ces résultats nous confirme l'hypothèse selon laquelle cette différence de captation est principalement due à une faible expression de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ à la surface des cellules IDH1+ plutôt qu'à la vascularisation des tumeurs comme décrit dans le paragraphe *in vivo* précédemment. En effet, dans l'étude IRM, nous avons associé l'expression de la mutation IDH1^{R132H} à un réseau vasculaire plus dense et plus fonctionnel, ce qui semble contradictoire. Cependant en faveur de notre hypothèse, les courbes dynamiques au $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ illustrent un *wash-out* plus rapide pour les tumeurs IDH1+, ce qui corrobore avec une décroissance de la pente plus importante, suggérant que ce radiotraceur ne reste pas piégé à l'intérieur de ces cellules tumorales.

Comme pour le $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$, nous avons montré une captation plus faible du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ dans les tumeurs IDH1+ à la fois *in vitro* et *in vivo*. Notamment, le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ présentait également dans l'analyse dynamique une diminution de la pente plus importante dans les tumeurs IDH1+. D'après nos résultats *in vitro* et *in vivo*, le $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ et le $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ sont des radiotraceurs TEP capable d'identifier les tumeurs IDH1+ au profil moins agressif.

A partir de ces données TEP très prometteuses, nous avons approfondi notre analyse en réalisant des tests de performances diagnostiques. Le résultat a été concluant puisque la combinaison du TBR_{max} et de la pente du $[^{68}\text{Ga}]\text{NODAGA}-(\text{RGDyK})_2$ associé à la pente du $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$ présente une haute valeur de performance prédictive de la mutation dans les tumeurs IDH1+ (AUC à 0,81, $p < 0.01$).

Bien qu'aucun de ces deux radiotraceurs d'intérêt ne traversent la BHE, nous savons que dans la majorité des cas de patients porteurs de gliomes de haut grade, cette dernière est altérée. Cela

ouvre des perspectives quant à leur application en clinique telle que la caractérisation de l'agressivité tumorale dans le suivi de traitements ou dans le diagnostic de récurrence.

Dans la littérature, d'autres études expérimentales ont tenté de développer des radiotraceurs candidats pour l'imagerie TEP de la mutation IDH1^{R132H}, mais la plupart d'entre elles ont donné des résultats peu concluants. Par exemple, Chitneni *et al.* ont proposé un analogue de la triazinediamine marqué au fluor-18 ([¹⁸F]1) [135]. Ce radiotraceur prometteur a montré une captation significativement plus élevée dans des tumeurs IDH1^{R132H} mutantes, cependant il présentait une instabilité dans le sang libérant une proportion importante de fluor-18 libre visible en *in vivo* par une intense fixation osseuse. Cette même équipe a testé la molécule AGI-5198, un anticorps spécifique connu de la mutation IDH1^{R132H}, marqué également au fluor-18 mais dès l'étape *in vivo* cette molécule a révélé un manque de sélectivité pour la mutation [136]. Dans une autre étude, Koyasu *et al.*, ont rapporté une accumulation intéressante d'acétate marqué au carbone-14 dans la lignée U251 exprimant la mutation IDH1^{R132H} mais ces expériences ont été réalisées dans un modèle de greffe tumoral sous-cutané, ce qui limite l'extrapolation de leurs résultats [137].

Nos résultats concernant les radiotraceurs TEP à base d'acides aminés ([¹⁸F]FDopa, [¹⁸F]FET et [¹¹C]MET) ont été tout aussi décevants. En effet, l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans notre modèle de tumeur n'a montré aucune différence ni *in vitro*, ni *in vivo* et ce malgré des données cliniques prometteuses avec ces trois radiotraceurs [65, 138]. Les résultats TEP au [¹⁸F]FDG sont moins surprenants et sont conformes à littérature puisque ce radiotraceur ne nous permettait pas de différencier correctement le tissu tumoral du cortex cérébral sain, ce qui limite son utilité en neuro-oncologie [50].

C. EX VIVO

Même si les résultats *ex vivo* d'immuno-histochimie ont confirmé les résultats de la TEP pour les récepteurs GLUT-1 et les transporteurs LAT-1 sans différence d'expression dans les deux types de tumeurs IDH1+ et IDH1-, les autres analyses ont été moins concluantes. En effet, nous n'avons trouvé aucune autre différence dans les marquages des vaisseaux, des intégrines $\alpha\beta3$ ou des récepteurs TSPO. Nous avons émis une première hypothèse selon laquelle le paramètre IRM de la densité vasculaire a quantifié uniquement les vaisseaux fonctionnels c'est-à-dire ceux qui ont été perfusés par l'agent de contraste, contrairement au marquage immuno-histochimique qui comptabilise la totalité des vaisseaux. Nous pouvons également justifier cette absence de différence par le petit nombre d'échantillons inclus dans l'analyse histologique (N=4) pour

chacune des tumeurs IDH1+ et IDH1-, la majeure partie des échantillons post-sacrifice ayant été utilisé pour la HR-MAS. Dans la littérature, des études *ex vivo* ont rapporté que la production de 2-HG dans des gliomes IDH1+ était responsable de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels [139, 140], venant renforcer nos résultats IRM. La deuxième hypothèse émise concerne la non-spécificité du motif peptidique RGDyK de notre radiotraceur TEP aux intégrines $\alpha\beta3$. En effet, l'intégrine $\alpha\beta3$ est en compétition de liaison avec une autre intégrine $\alpha\beta5$ reconnu également par la séquence RGDyK [141]. Cependant nous ne disposions plus d'échantillons tumoraux pour explorer cette piste.

De même, nous n'avons pas réussi à démontrer de différence de niveaux d'expression des récepteurs TSPO, mais nous pouvons en partie l'expliquer par la participation de la microglie et des macrophages activés (GAM) au signal du [^{18}F]DPA-714 [142] mais dont les marquages immuno-histochimiques n'ont pu être réalisés par manque d'échantillons comme précisé précédemment. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux définir la localisation spécifique de captation des radiotraceurs notamment avec des analyses d'historadiographies.

II. LES LIMITATIONS

Notre étude présente plusieurs limites. La première est celle des volumes tumoraux *in vivo*. En effet, les tumeurs IDH1+ se sont avérés être deux fois plus petites que les tumeurs IDH1- dans l'étude par IRM. Cette différence aurait pu influencer les paramètres fonctionnels notamment ceux caractérisant la vascularisation tumorale mais après une vérification par une analyse statistique la densité vasculaire et le TTP étaient tous les deux des facteurs prédictifs de la mutation IDH1^{R132H} et indépendants du volume des tumeurs. Après une meilleure maîtrise du modèle, les volumes de tumeurs IDH1+ dans l'étude en TEP ont été statistiquement similaires à ceux des tumeurs IDH1-, mais nous avons observé tout de même une certaine variabilité de la croissance tumorale entre les groupes. Cependant la concordance des résultats à la fois en *in vitro* et en *in vivo* suggère que l'effet potentiel sur les paramètres évalués a été limité.

La deuxième limitation a été la survenue de problèmes techniques dans la synthèse de certains radiotraceurs, puisque nous n'avons pas pu obtenir tous les radiotraceurs à temps pour certaines sessions d'imagerie TEP. La conséquence a été que la majorité des tumeurs n'a pas pu être imagée avec les six radiotraceurs d'intérêts.

Chapitre IX.

LA SYNTHÈSE ET LES PERSPECTIVES

I. LA CONCLUSION GÉNÉRALE	111
II. LES PERSPECTIVES	111

I. LA CONCLUSION GENERALE

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la caractérisation de la mutation IDH1^{R132H} par TEP/IRM multimodale était associée à un profil moins agressif dans les tumeurs l'exprimant. Notamment, nous avons mis en évidence *in vitro* des niveaux d'expression des intégrines $\alpha\beta3$ et des récepteurs TSPO plus faibles dans les tumeurs IDH1+, ces deux paramètres représentant des marqueurs biologiques d'agressivité dans les voies de l'angiogenèse et de l'inflammation tumorale.

Nous avons aussi découvert en IRM *in vivo* une densité vasculaire plus élevée dans notre modèle de tumeur IDH1+ mais ces tumeurs présentaient surtout une perméabilité des vaisseaux plus faible, suggérant une meilleure fonctionnalité du réseau vasculaire, se rapprochant davantage des caractéristiques retrouvées dans la vascularisation d'un cerveau sain. De plus, les spectres par résonance magnétique sont venus renforcer nos résultats avec des variations de concentrations en métabolites en faveur d'un profil moins agressif pour les tumeurs IDH1+.

Pour finir, nous avons réussi à obtenir de bonnes performances diagnostiques dans la discrimination de la mutation IDH1^{R132H} en combinant des paramètres statiques et dynamiques en imagerie TEP avec les radiotraceurs au [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ et au [¹⁸F]DPA-714. *Ex vivo*, l'analyse spectroscopique retrouvait un profil en métabolites moins agressif.

Notre étude originale montre le potentiel de l'imagerie multimodale pour caractériser de manière non-invasive la mutation IDH1^{R132H} et associe la mutation IDH1^{R132H} à un profil de moindre agressivité tumorale, ce qui peut en partie expliquer la meilleure réponse de ces tumeurs aux traitements appliqués.

II. LES PERSPECTIVES

Dans un premier temps, il sera indispensable de confirmer l'ensemble de nos résultats sur d'autres lignées cellulaires et en particulier des échantillons *patient-derived xenograft* (PDX). Avec la collaboration du Dr Fabien Rech, neurochirurgien au CHRU-Nancy, des échantillons d'exérèse de gliomes à l'état frais vont être xénogreffés directement en sous-cutané chez la souris. Cette étape permettra une surveillance macroscopique d'une reprise de croissance de la tumeur. En parallèle une caractérisation histologique et moléculaire des tumeurs se fera dans le service d'anatomopathologie avec notamment le diagnostic de la mutation IDH1^{R132H}. Nous appliquerons ensuite à l'identique le protocole d'imagerie TEP multitraceurs. Nous ajouterons cependant une analyse par historadiographie des échantillons tumoraux afin de localiser *ex vivo*

les zones de captations des différents radiotraceurs et nous compléterons les effectifs des différents marqueurs immuno-histochimiques.

Nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser une analyse globale des données d'imagerie car les deux sessions IRM et TEP multiparamétriques ont été réalisées sur des groupes d'animaux différents. Néanmoins dans notre démarche d'étude translationnelle, si les résultats se confirment sur les tumeurs PDX, nous souhaiterions davantage mettre en évidence le potentiel de la multimodalité en réduisant les acquisitions d'imagerie aux marqueurs d'intérêt dans cette étude, représenté par le paramètre de la densité vasculaire et par la séquence DCE en IRM, associé aux radiotraceurs [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ et [^{18}F]DPA-714 en TEP pour optimiser la détection non-invasive de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs.

Dans une approche translationnelle clinique, et au vu des contraintes de dosimétrie et du coût des productions des nouveaux radiotraceurs, le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ pourrait être un radiotraceur de choix par rapport au [^{18}F]DPA-714. En effet, bien que les valeurs d'AUC soient proches pour ces deux radiotraceurs, avec une AUC de $0,77 \pm 0,06$ pour le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ et une AUC de $0,73 \pm 0,06$ pour le [^{18}F]DPA-714, le [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ semble être un choix prometteur puisqu'il offre la possibilité d'une évaluation TEP multiparamétrique par la combinaison des données statiques et dynamiques apportant des informations complémentaires comme décrit dans cette étude.

L'intérêt à moyen terme est la translation de nos résultats sur une étude clinique afin de mieux appréhender la caractérisation non invasive de la mutation IDH1^{R132H}, mais également de bénéficier du potentiel des paramètres d'imagerie multimodale identifiés dans la prise en charge des gliomes. Nous pensons notamment à une application de notre méthodologie dans le cas d'une caractérisation plus précoce de récidives et/ou dans le cas d'un diagnostic différentiel de la radionécrose. En effet, l'application de traitements de chimiothérapie, notamment l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques et/ou de radiothérapie, peuvent induire une modification de l'imagerie tumorale difficile d'interprétation. L'IRM conventionnelle (T $_1$, T $_2$, T $_2$ -FLAIR, T $_1$ -Gadolinium) n'est dans certains cas pas suffisante pour distinguer par exemple une pseudo-progression d'une véritable récidive, l'imagerie métabolique multiparamétrique et plus spécifiquement grâce aux nouveaux radiotraceurs peut apporter un complément d'information pertinent dans la caractérisation tumorale et permettre aux cliniciens d'être confortés dans le choix de la prise en charge thérapeutique.

LES RÉFÉRENCES

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
2. SongTao Q, Lei Y, Si G, et al (2012) IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci* 103:269–273. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02134.x>
3. Tran AN, Lai A, Li S, et al (2014) Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro-Oncol* 16:414–420. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not198>
4. Law I, Albert NL, Arbizu J, et al (2019) Joint EANM/EANO/RANO practice guidelines/SNMMI procedure standards for imaging of gliomas using PET with radiolabelled amino acids and [18F]FDG: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 46:540–557. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4207-9>
5. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683–2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>
6. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S (2014) IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. *JAMA Neurol* 71:1319–1325. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1205>
7. Hartmann C, von Deimling A (2009) Molecular pathology of oligodendroglial tumors. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer* 171:25–49. https://doi.org/10.1007/978-3-540-31206-2_2
8. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360:765–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
9. Dang L, White DW, Gross S, et al (2010) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 465:966. <https://doi.org/10.1038/nature09132>

10. Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Cairncross G, Berkey B, et al (2006) Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24:2707–2714. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.3414>
11. Wesseling P, van den Bent M, Perry A (2015) Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)* 129:809–827. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1424-1>
12. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al (2017) Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol (Berl)* 133:1001–1016. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1690-1>
13. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6021–6026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>
14. Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100:2235–2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>
15. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncol* 21:v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
16. Bauchet L, Mathieu-Daudé H, Fabbro-Peray P, et al (2010) Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004. *Neuro-Oncol* 12:725–735. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq030>
17. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, et al (2015) Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res* 163:1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_1
18. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, et al (2015) Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)* 129:829–848. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
19. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>

20. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
21. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>
22. Chien WW, French M (2006) [Regulation of p16INK4a, senescence and oncogenesis]. *Med Sci MS* 22:865–871. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062210865>
23. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
24. Van Meir EG, Haddjipanayis CG, Norden AD, et al (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60:166–193. <https://doi.org/10.3322/caac.20069>
25. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al (2010) IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 75:1560–1566. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f96282>
26. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, et al (2018) Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. *Neurosurg Rev* 41:641–647. <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0908-y>
27. Kaelin WG, Ratcliffe PJ (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30:393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
28. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, et al (2002) Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 109:777–785. <https://doi.org/10.1172/JCI14105>
29. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al (2009) Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 324:261–265. <https://doi.org/10.1126/science.1170944>

30. Larsen M, Willems WF, Pelzer M, et al (2010) Augmentation of surgical angiogenesis in vascularized bone allotransplants with host-derived a/v bundle implantation, fibroblast growth factor-2, and vascular endothelial growth factor administration. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 28:1015–1021. <https://doi.org/10.1002/jor.21098>
31. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, et al (2012) Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483:484–488. <https://doi.org/10.1038/nature10898>
32. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466:1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
33. Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al (2012) IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483:479–483. <https://doi.org/10.1038/nature10866>
34. Yang H, Ye D, Guan K-L, Xiong Y (2012) IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:5562–5571. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1773>
35. Masui K, Cavenee WK, Mischel PS (2016) Cancer metabolism as a central driving force of glioma pathogenesis. *Brain Tumor Pathol* 33:161–168. <https://doi.org/10.1007/s10014-016-0265-5>
36. Capper D, Weissert S, Balss J, et al (2010) Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol Zurich Switz* 20:245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00352.x>
37. Mandel JJ, Cachia D, Liu D, et al (2016) Impact of IDH1 mutation status on outcome in clinical trials for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 129:147–154. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2157-2>
38. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al (2015) Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 314:2535–2543. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.16669>

39. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R (2009) FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The Oncologist* 14:1131–1138. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0121>
40. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al (2014) Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370:709–722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>
41. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al (2014) A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370:699–708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573>
42. de Groot JF, Piao Y, Tran H, et al (2011) Myeloid biomarkers associated with glioblastoma response to anti-VEGF therapy with aflibercept. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:4872–4881. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0271>
43. Balaña C, Gil MJ, Perez P, et al (2014) Sunitinib administered prior to radiotherapy in patients with non-resectable glioblastoma: results of a phase II study. *Target Oncol* 9:321–329. <https://doi.org/10.1007/s11523-014-0305-1>
44. Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T (2008) Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs* 17:1225–1235. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.8.1225>
45. Seystahl K, Gramatzki D, Roth P, Weller M (2016) Pharmacotherapies for the treatment of glioblastoma - current evidence and perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 17:1259–1270. <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1176146>
46. Ishikawa E, Muragaki Y, Yamamoto T, et al (2014) Phase I/IIa trial of fractionated radiotherapy, temozolomide, and autologous formalin-fixed tumor vaccine for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg* 121:543–553. <https://doi.org/10.3171/2014.5.JNS132392>
47. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, et al (2014) A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512:324–327. <https://doi.org/10.1038/nature13387>
48. Dunn GP, Cloughesy TF, Maus MV, et al (2020) Emerging immunotherapies for malignant glioma: from immunogenomics to cell therapy. *Neuro-Oncol* 22:1425–1438. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa154>

49. Dupont C, Vermandel M, Reyns N, Mordon S (2018) [Photodynamic therapy for the treatment of glioblastoma in neurosurgery]. *Med Sci MS* 34:901–903. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018225>
50. Albert NL, Weller M, Suchorska B, et al (2016) Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro-Oncol* 18:1199–1208. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now058>
51. Emir UE, Larkin SJ, de Pennington N, et al (2016) Noninvasive Quantification of 2-Hydroxyglutarate in Human Gliomas with IDH1 and IDH2 Mutations. *Cancer Res* 76:43–49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0934>
52. Leather T, Jenkinson MD, Das K, Poptani H (2017) Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of 2-Hydroxyglutarate as a Biomarker for IDH Mutation in Gliomas. *Metabolites* 7:. <https://doi.org/10.3390/metabo7020029>
53. Crisi G, Filice S, Michiara M, et al (2018) 2-Hydroxyglutarate Detection by Short Echo Time Magnetic Resonance Spectroscopy in Routine Imaging Study of Brain Glioma at 3.0 T. *J Comput Assist Tomogr* 42:469–474. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000705>
54. Phuttharak W, Thammaroj J, Wara-Asawapati S, Panpeng K (2020) Grading Gliomas Capability: Comparison between Visual Assessment and Apparent Diffusion Coefficient (ADC) Value Measurement on Diffusion-Weighted Imaging (DWI). *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 21:385–390. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.2.385>
55. Troprès I, Grimault S, Vaeth A, et al (2001) Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 45:397–408. [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200103\)45:3<397::aid-mrm1052>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200103)45:3<397::aid-mrm1052>3.0.co;2-3)
56. Troprès I, Pannetier N, Grand S, et al (2015) Imaging the microvessel caliber and density: Principles and applications of microvascular MRI. *Magn Reson Med* 73:325–341. <https://doi.org/10.1002/mrm.25396>
57. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, et al (2016) Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. *Neuro-Oncol* 18:1559–1568. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now090>

58. Tiwari V, Mashimo T, An Z, et al (2020) In vivo MRS measurement of 2-hydroxyglutarate in patient-derived IDH-mutant xenograft mouse models versus glioma patients. *Magn Reson Med*. <https://doi.org/10.1002/mrm.28183>
59. Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, et al (2012) Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol* 107:197–205. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0737-8>
60. Lazovic J, Soto H, Piccioni D, et al (2012) Detection of 2-hydroxyglutaric acid in vivo by proton magnetic resonance spectroscopy in U87 glioma cells overexpressing isocitrate dehydrogenase-1 mutation. *Neuro-Oncol* 14:1465–1472. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos258>
61. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, et al (2012) 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med* 18:624–629. <https://doi.org/10.1038/nm.2682>
62. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA (2009) From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 50 Suppl 1:122S–50S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.057307>
63. Albert NL, Weller M, Suchorska B, et al (2016) Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro-Oncol* 18:1199–1208. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now058>
64. Chen W (2007) Clinical applications of PET in brain tumors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 48:1468–1481. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037689>
65. Verger A, Metellus Ph, Sala Q, et al (2017) IDH mutation is paradoxically associated with higher 18F-FDOPA PET uptake in diffuse grade II and grade III gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44:1306–1311. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3668-6>
66. Nomura Y, Asano Y, Shinoda J, et al (2018) Characteristics of time-activity curves obtained from dynamic 11C-methionine PET in common primary brain tumors. *J Neurooncol* 138:649–658. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2834-4>

67. Grosu A-L, Weber WA, Riedel E, et al (2005) L-(methyl-11C) methionine positron emission tomography for target delineation in resected high-grade gliomas before radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.01.045>
68. Deuschl C, Goericke S, Grueneisen J, et al (2016) Simultaneous 11C-Methionine Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging of Suspected Primary Brain Tumors. *PloS One* 11:e0167596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167596>
69. Fueger BJ, Czernin J, Cloughesy T, et al (2010) Correlation of 6-18F-fluoro-L-dopa PET uptake with proliferation and tumor grade in newly diagnosed and recurrent gliomas. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 51:1532–1538. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.078592>
70. Schwarzenberg J, Czernin J, Cloughesy TF, et al (2014) Treatment response evaluation using 18F-FDOPA PET in patients with recurrent malignant glioma on bevacizumab therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 20:3550–3559. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1440>
71. Floeth FW, Pauleit D, Wittsack H-J, et al (2005) Multimodal metabolic imaging of cerebral gliomas: positron emission tomography with [18F]fluoroethyl-L-tyrosine and magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 102:318–327. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.102.2.0318>
72. Hayes AR, Jayamanne D, Hsiao E, et al (2018) Utilizing 18F-fluoroethyltyrosine (FET) positron emission tomography (PET) to define suspected nonenhancing tumor for radiation therapy planning of glioblastoma. *Pract Radiat Oncol* 8:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.prro.2018.01.006>
73. Frosina G (2016) Non-routine Tracers for PET Imaging of High-grade Glioma. *Anticancer Res* 36:3253–3260
74. Schnell O, Krebs B, Wagner E, et al (2008) Expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol Zurich Switz* 18:378–386. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00137.x>
75. Li Z-B, Chen K, Chen X (2008) (68)Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:1100–1108. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0692-y>

76. Liu S (2006) Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin $\alpha v \beta 3$ targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol Pharm* 3:472–487. <https://doi.org/10.1021/mp060049x>
77. Oxboel J, Brandt-Larsen M, Schjoeth-Eskesen C, et al (2014) Comparison of two new angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl Med Biol* 41:259–267. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.12.003>
78. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, et al (2014) Does imaging $\alpha v \beta 3$ integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 55:1878–1884. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.137570>
79. Korkhov VM, Sachse C, Short JM, Tate CG (2010) Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Struct Lond Engl* 19:677–687. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.03.001>
80. Cosenza-Nashat M, Zhao M-L, Suh H-S, et al (2009) Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:306–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01006.x>
81. Chen M-K, Guilarte TR (2008) Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.12.004>
82. Wang M, Wang X, Zhao L, et al (2014) Macrogliia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:3793–3806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3153-13.2014>
83. Bae K-R, Shim H-J, Balu D, et al (2014) Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 9:424–437. <https://doi.org/10.1007/s11481-014-9540-6>
84. Tan Y, Mu W, Wang X-C, et al (2019) Improving survival prediction of high-grade glioma via machine learning techniques based on MRI radiomic, genetic and clinical risk factors. *Eur J Radiol* 120:108609. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2019.07.010>

85. Li L, Mu W, Wang Y, et al (2019) A Non-invasive Radiomic Method Using 18F-FDG PET Predicts Isocitrate Dehydrogenase Genotype and Prognosis in Patients With Glioma. *Front Oncol* 9:1183. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01183>
86. Lo C-M, Weng R-C, Cheng S-J, et al (2020) Computer-aided diagnosis of isocitrate dehydrogenase genotypes in glioblastomas from radiomic patterns. *Medicine (Baltimore)* 99:e19123. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019123>
87. Radaelli E, Ceruti R, Patton V, et al (2009) Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol Histopathol* 24:879–891. <https://doi.org/10.14670/HH-24.879>
88. Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al (2007) Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 85:133–148. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9400-9>
89. Yu S-C, Ping Y-F, Yi L, et al (2008) Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett* 265:124–134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.010>
90. Shi J, Zhao Y, Yuan Y, et al (2016) [The expression of IDH1 (R132H) is positively correlated with cell proliferation and angiogenesis in glioma samples]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol* 32:360–363
91. Shi J, Sun B, Shi W, et al (2015) Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 36:655–662. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2644-z>
92. Bralten LBC, Kloosterhof NK, Balvers R, et al (2011) IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 69:455–463. <https://doi.org/10.1002/ana.22390>
93. Toussaint M, Pinel S, Auger F, et al (2017) Proton MR Spectroscopy and Diffusion MR Imaging Monitoring to Predict Tumor Response to Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastoma. *Theranostics* 7:436–451. <https://doi.org/10.7150/thno.17218>

94. Lemasson B, Serduc R, Maisin C, et al (2010) Monitoring blood-brain barrier status in a rat model of glioma receiving therapy: dual injection of low-molecular-weight and macromolecular MR contrast media. *Radiology* 257:342–352. <https://doi.org/10.1148/radiol.10092343>
95. Agarwal S, Manchanda P, Vogelbaum MA, et al (2013) Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 41:33–39. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.048322>
96. Otabashi M, Vergote T, Desfours C (2017) High yield ¹⁸F-FET production on AllinOne (Trasis) at commercial scale. *J Nucl Med* 58:879–879
97. Vergote T, Otabashi M, Desfours C (2017) A single-use cassette for the automated high-output production of ¹¹C-Methionine. *J Nucl Med* 58:880–880
98. Isal S, Pierson J, Imbert L, et al (2018) PET imaging of ⁶⁸Ga-NODAGA-RGD, as compared with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. *EJNMMI Res* 8:51. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0405-5>
99. Kuhnast B, Damont A, Hinnen F, et al (2012) [¹⁸F]DPA-714, [¹⁸F]PBR111 and [¹⁸F]FEDAA1106-selective radioligands for imaging TSPO 18 kDa with PET: automated radiosynthesis on a TRACERLab FX-FN synthesizer and quality controls. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med* 70:489–497. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.10.015>
100. (2020) nifm-gin/MP3. nifm-gin
101. Hirschler L, Debacker CS, Voiron J, et al (2018) Interpulse phase corrections for unbalanced pseudo-continuous arterial spin labeling at high magnetic field. *Magn Reson Med* 79:1314–1324. <https://doi.org/10.1002/mrm.26767>
102. Buxton RB, Frank LR, Wong EC, et al (1998) A general kinetic model for quantitative perfusion imaging with arterial spin labeling. *Magn Reson Med* 40:383–396. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910400308>
103. Alsop DC, Detre JA, Golay X, et al (2015) Recommended implementation of arterial spin-labeled perfusion MRI for clinical applications: A consensus of the ISMRM perfusion study group and the European consortium for ASL in dementia. *Magn Reson Med* 73:102–116. <https://doi.org/10.1002/mrm.25197>

104. Debacker CS, Daoust A, Köhler S, et al (2017) Impact of tissue T1 on perfusion measurement with arterial spin labeling. *Magn Reson Med* 77:1656–1664. <https://doi.org/10.1002/mrm.26255>
105. Lemasson B, Valable S, Farion R, et al (2013) In vivo imaging of vessel diameter, size, and density: a comparative study between MRI and histology. *Magn Reson Med* 69:18–26. <https://doi.org/10.1002/mrm.24218>
106. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al (2011) Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed* 24:393–403. <https://doi.org/10.1002/nbm.1603>
107. Baudry J-P, Maugis C, Michel B (2012) Slope heuristics: overview and implementation. *Stat Comput* 22:455–470. <https://doi.org/10.1007/s11222-011-9236-1>
108. Verger A, Taieb D, Guedj E (2017) Is the information provided by amino acid PET radiopharmaceuticals clinically equivalent in gliomas? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44:1408–1410. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3710-8>
109. Roncaroli F, Su Z, Herholz K, et al (2016) TSPO expression in brain tumours: is TSPO a target for brain tumour imaging? *Clin Transl Imaging* 4:145–156. <https://doi.org/10.1007/s40336-016-0168-9>
110. Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, et al (1995) Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res* 55:2691–2695
111. Belloli S, Brioschi A, Politi LS, et al (2013) Characterization of biological features of a rat F98 GBM model: a PET-MRI study with [18F]FAZA and [18F]FDG. *Nucl Med Biol* 40:831–840. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.05.004>
112. Verhoeven J, Bolcaen J, De Meulenaere V, et al (2019) Technical feasibility of [18F]FET and [18F]FAZA PET guided radiotherapy in a F98 glioblastoma rat model. *Radiat Oncol Lond Engl* 14:89. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1290-4>
113. Watabe T, Ikeda H, Nagamori S, et al (2017) 18F-FBPA as a tumor-specific probe of L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a comparison study with 18F-FDG and 11C-Methionine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44:321–331. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3487-1>

114. Tang D, Li J, Nickels ML, et al (2019) Preclinical Evaluation of a Novel TSPO PET Ligand 2-(7-Butyl-2-(4-(2-[¹⁸F]Fluoroethoxy)phenyl)-5-Methylpyrazolo[1,5-a]Pyrimidin-3-yl)-N,N-Diethylacetamide (18F-VUIIS1018A) to Image Glioma. *Mol Imaging Biol* 21:113–121. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1198-7>
115. Zijdenbos AP, Dawant BM, Margolin RA, Palmer AC (1994) Morphometric analysis of white matter lesions in MR images: method and validation. *IEEE Trans Med Imaging* 13:716–724. <https://doi.org/10.1109/42.363096>
116. Stekhoven DJ, Bühlmann P (2012) MissForest--non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinforma Oxf Engl* 28:112–118. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597>
117. Čuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I (2010) Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today* 15:610–621. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.012>
118. Pouget C, Hergalant S, Lardenois E, et al (2019) Ki-67 and MCM6 labelling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, *IDH1* -mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathol* bpa.12788. <https://doi.org/10.1111/bpa.12788>
119. Vlodavsky E, Soustiel JF (2007) Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. *J Neurooncol* 81:1–7. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9199-9>
120. Unterrainer M, Fleischmann DF, Diekmann C, et al (2019) Comparison of 18F-GE-180 and dynamic 18F-FET PET in high grade glioma: a double-tracer pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 46:580–590. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4166-1>
121. Seguin L, Kato S, Franovic A, et al (2014) An integrin β_3 -KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol* 16:457–468. <https://doi.org/10.1038/ncb2953>
122. Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, et al (2009) An integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 15:1163–1169. <https://doi.org/10.1038/nm.2009>

123. Cairns RA, Khokha R, Hill RP (2003) Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 3:659–671. <https://doi.org/10.2174/1566524033479447>
124. Felding-Habermann B (2003) Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 20:203–213. <https://doi.org/10.1023/a:1022983000355>
125. Chaumeil MM, Larson PEZ, Yoshihara HAI, et al (2013) Non-invasive in vivo assessment of IDH1 mutational status in glioma. *Nat Commun* 4:2429. <https://doi.org/10.1038/ncomms3429>
126. Stadlbauer A, Zimmermann M, Kitzwögerer M, et al (2017) MR Imaging–derived Oxygen Metabolism and Neovascularization Characterization for Grading and *IDH* Gene Mutation Detection of Gliomas. *Radiology* 283:799–809. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016161422>
127. Lu HT, Xing W, Zhang YW, et al (2019) [The value of DCE-MRI in predicting IDH gene mutation of high-grade gliomas]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 99:3105–3109. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.39.013>
128. Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, et al (2015) Metabolic reprogramming in mutant IDH1 glioma cells. *PloS One* 10:e0118781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118781>
129. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, et al (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3270–3275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019393108>
130. Gómez-Angelats M, Cidlowski JA (2002) Cell volume control and signal transduction in apoptosis. *Toxicol Pathol* 30:541–551. <https://doi.org/10.1080/01926230290105820>
131. Gandía-González ML, Cerdán S, Barrios L, et al (2019) Assessment of Overall Survival in Glioma Patients as Predicted by Metabolomic Criteria. *Front Oncol* 9:328. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00328>
132. Sontheimer H (2008) A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem* 105:287–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05301.x>
133. Guo J, Yao C, Chen H, et al (2012) The relationship between Cho/NAA and glioma metabolism: implementation for margin delineation of cerebral gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 154:1361–1370; discussion 1370. <https://doi.org/10.1007/s00701-012-1418-x>

134. Jalbert LE, Elkhaled A, Phillips JJ, et al (2017) Metabolic Profiling of IDH Mutation and Malignant Progression in Infiltrating Glioma. *Sci Rep* 7:44792. <https://doi.org/10.1038/srep44792>
135. Chitneni SK, Yan H, Zalutsky MR (2018) Synthesis and Evaluation of a ¹⁸F-Labeled Triazinediamine Analogue for Imaging Mutant IDH1 Expression in Gliomas by PET. *ACS Med Chem Lett* 9:606–611. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00478>
136. Chitneni SK, Reitman ZJ, Spicehandler R, et al (2018) Synthesis and evaluation of radiolabeled AGI-5198 analogues as candidate radiotracers for imaging mutant IDH1 expression in tumors. *Bioorg Med Chem Lett* 28:694–699. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.015>
137. Koyasu S, Shimizu Y, Morinibu A, et al (2019) Increased ¹⁴C-acetate accumulation in IDH-mutated human glioblastoma: implications for detecting IDH-mutated glioblastoma with ¹¹C-acetate PET imaging. *J Neurooncol* 145:441–447. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03322-9>
138. Ginet M, Zaragori T, Marie P-Y, et al (2020) Integration of dynamic parameters in the analysis of ¹⁸F-FDopa PET imaging improves the prediction of molecular features of gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 47:1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04509-y>
139. Seok J, Yoon S, Lee S, et al (2018) The oncometabolite d-2-hydroxyglutarate induces angiogenic activity through the vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling pathway. *Int J Oncol*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4649>
140. Mao MJ, Leonardi DE (2019) Vascular-endothelial response to IDH1 mutant fibrosarcoma secretome and metabolite: implications on cancer microenvironment. *Am J Cancer Res* 9:122–133
141. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, et al (2017) A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci Rep* 7:39805. <https://doi.org/10.1038/srep39805>
142. Winkeler A, Boisgard R, Awde AR, et al (2012) The translocator protein ligand [¹⁸F]DPA-714 images glioma and activated microglia in vivo. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39:811–823. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-2041-4>

LES ANNEXES

Tableau 11. Concentrations et variations des métabolites induit par l'expression de la mutation IDH1^{R132H} dans les tumeurs en SRM et HR-MAS. En gras, un test de Mann-Whitney avec une significativité à $p < 0,05$.

SRM				
Métabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ versus IDH1-	p
GABA	2,23±0,51	1,18±0,75	↗	p=0,01
GLN	5,83±0,60	4,93±1,29	=	p=0,14
GLU	17,07±1,16	16,79±1,29	=	p=0,83
GLX	22,90±1,28	21,71±2,12	=	p=0,21
GSH	3,03±0,27	3,40±0,47	↘	p=0,05
PCR	5,04±1,03	3,21±1,43	↗	p=0,03
TAU	8,81±1,32	6,25±1,33	↗	p<0,01
PCHO	3,23±1,19	2,61±0,88	↗	p=0,03
M-INS	5,97±0,45	4,80±0,81	↗	p=0,01
GPC	3,48±0,68	3,17±0,88	=	p=0,58
tCHO	5,79±0,79	6,71±1,57	=	p=0,19
NAA	10,94±1,21	7,77±2,09	↗	p=0,01
tCHO/NAA	0,54±0,12	0,96±0,42	↘	p=0,04
ASP	6,96±1,01	6,15±0,77	=	p=0,11
ALA	1,84±0,69	1,86±0,59	=	p=0,92
LAC	4,43±1,28	3,08±1,08	↗	p=0,05
Cr	5,52±0,61	4,79±0,61	↗	p=0,04
HR-MAS				
Métabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ versus IDH1-	Significance
GABA	5,17E-03±1,25E-03	3,91E-03±1,26E-03	=	p=0,22
GLN	1,12E-02±2,21E-03	1,01E-02 ±3,55E-03	=	p=0,49
GLU	3,37E-02±1,84E-03	4,75E-02±4,24E-03	↘	p<0,01
GLX	4,49E-02±4,45E-03	5,76E-02±5,17E-03	↘	p<0,01
GSH	5,82E-03±5,78E-04	8,94E-03±1,02E-03	↘	p<0,01
PCR	1,73E-02 ±3,46E-03	1,03E-02 ±3,90E-03	↗	p=0,03
TAU	2,37E-02 ±3,66E-03	1,78E-02 ±3,02E-03	↗	p=0,03
PCHO	7,00E-03 ±9,64E-04	1,19E-02 ±2,57E-03	=	p=0,49
M-INS	1,73E-02 ±2,51E-03	1,35E-02 ±6,11E-04	↗	p=0,02
GPC	1,56E-02 ±3,48E-03	1,63E-02 ±3,29E-03	=	p=0,90
tCHO	2,82E-02 ±7,47E-03	2,27E-02 ±6,90E-03	=	p=0,20
NAA	1,00E-02±4,45E-03	3,91E-03 ±3,75E-03	↗	p=0,05

tCHO/NAA	21,91±17,34	3,62±2,80	=	p=0,12
ASP	5,88E-03±1,60E-03	7,75E-03 ±2,34E-03	=	p=0,25
ALA	8,75E-03±1,12E-03	8,68E-03 ±9,02E-04	=	p=0,66
LAC	7,76E-02±4,53E-03	6,20E-02±1,27E-02	=	p=0,12
ACE	4,35E-04±1,35E-04	1,23E-04 ±1,43E-04	↗	p=0,02
BETAINE	2,61E-03 ±4,32E-04	2,20E-03 ±1,63E-04	↗	p=0,03
SUCCINATE	3,92E-04 ±1,42E-04	6,69E-04 ±1,24E-04	↘	p=0,03
VAL	2,84E-04 ±1,06E-04	4,74E-04 ±1,47E-04	=	p=0,12
B-OH	1,68E-03 ±1,75E-04	2,02E-03 ±3,46E-04	=	p=0,22
GLY	4,82E-03 ±5,33E-04	5,28E-03 ±7,59E-04	=	p=0,58
SER	3,35E-04 ±4,18E-04	1,49E-03 ±1,27E-03	=	p=0,19
ASC	1,51E-03 ±9,29E-04	1,33E-04 ±2,28E-04	↗	p<0,01
PE	6,43E-03±9,28E-04	5,23E-03 ±2,25E-03	=	p=0,22
HYPO	8,46E-04±4,20E-04	1,75E-03 ±5,17E-04	↘	p=0,04

L'ARTICLE N°1

***In vivo* characterization by multiparametric magnetic resonance imaging and spectroscopy of physiological and metabolic changes on orthotopic human derived glioblastoma models related to the isocitrate dehydrogenase 1-mutation expression**

Alexandra Clément ^{#,1,2}, Matthieu Doyen ^{1,2}, Florence Fauvelle ⁴, Gabriela Hossu ^{2,3}, Bailiang Chen ^{2,3}, Muriel Barberi-Heyob ⁵, Alex Hirtz ⁵, Zohra Lamiral ⁶, Celso Pouget ⁷, Guillaume Gauchotte ⁷, Gilles Karcher ^{1,8}, Marine Beaumont ^{2,3}, Antoine Verger ^{1,2,8}, Benjamin Lemasson ⁴

¹Nancyclotep Molecular and Experimental Imaging Platform, CHRU-Nancy, France

²Lorraine University, INSERM, IADI UMR 1254, Nancy, France

³Lorraine University, CIC-IT UMR 1433, CHRU-Nancy, France

⁴Grenoble University, INSERM, GIN UMR 1216, Grenoble, France

⁵Lorraine University, CNRS, CRAN UMR 7039, Nancy, France

⁶Lorraine University, INSERM, DCAC UMR 1116, Nancy, France

⁷Department of Pathology, CHRU-Nancy, France

⁸Department of Nuclear Medicine, CHRU-Nancy, France

Corresponding author: # Alexandra Clément, Nancyclotep Molecular and Experimental Imaging Platform, CHRU-Nancy, France, 05 rue du Morvan 54500 Vandoeuvre-Les-Nancy, PHONE: +33 03 83 15 78 11, FAX: +33 03 83 15 78 10, E-MAIL: a.clement@nancyclotep.com

Orcid: Alexandra CLEMENT  [0000-0003-2982-3070](https://orcid.org/0000-0003-2982-3070)

Declarations: The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

The physiological mechanism induced by the isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation, associated to better treatment response in gliomas, is still unknown. The aim of this preclinical study was to characterize IDH1 mutation through *in vivo* multiparametric MRI and magnetic resonance spectroscopy (MRS). Multiparametric MRI, including the measurement of blood flow, vascularity, oxygenation, permeability and MRS were performed on a 4.7 T animal MRI in rat brains grafted with U87 cell lines human derived glioblastoma expressing or not the IDH1 mutation by the CRISPR/Cas9 method, and secondarily characterized with additional HR-MAS and histological analyses. In univariate analyses, compared to IDH1-, IDH1+ tumors exhibited higher vascular density ($p<0.01$), better perfusion ($p=0.02$ for cerebral blood flow), but lower vessel permeability ($p<0.01$ for time-to-peak (TTP), $p=0.04$ for contrast enhancement). Using linear discriminant analysis, vascular density and TTP values were found to be independent MRI parameters for characterizing the IDH1 mutation ($p<0.01$). MRS and HR-MAS analysis showed lower metabolites of tumor aggressiveness for IDH1+ tumors ($p<0.01$). Overall, the IDH1 mutation exhibited higher vascularity only seen in MRI, lower permeability and less aggressive metabolic profile. These MRI features may prove helpful to better pinpoint the physiological mechanisms induced by this mutation.

KEYWORDS: glioma, preclinical, orthotopic, IDH1, MRI, spectroscopy, characterization

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) has recently updated the tumor classification of the Central Nervous System by integrating molecular parameters and in particular the isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation ¹, for which its expression is associated with a better response to chemo- and radiotherapy in gliomas ^{2,3}.

From a metabolic standpoint, the *IDH1* mutation leads to an intracytoplasmic accumulation of the 2-hydroxyglutarate (2-HG) through its reduction from α -ketoglutarate (α -KG), a key component of the Krebs cycle⁴. The accumulation of 2-HG alters the glioma epigenome through increased DNA methylation^{5,6}, activates cellular malignant transformation^{7,8}, and results in a change in global tumor metabolism by inducing cellular toxicity^{9,10}. All of these modifications contribute to produce reactive oxygen species and induce an increased sensitivity to oxidative damages that could partly explain the better response to treatments observed in *IDH1*-mutant tumors^{2,3,11}. The exact mechanisms induced by this metabolite remain nonetheless widely unknown.

The biological events at the molecular, cellular and tissue levels resulting from the *IDH1* mutation should nevertheless be monitored, preferentially through a non-invasive method, as it can be used as a prognostic biomarker for tumors at initial diagnosis. Among the *in vivo* techniques, ¹H magnetic resonance spectroscopy (MRS) appears as the most promising tool for the identification of *IDH1* mutant gliomas by highlighting higher levels of 2-HG in these tumors^{12–14}. Nevertheless, this method has demonstrated a relatively high incidence of false positive results ranging from 18.5% to 26%¹⁵. Nowadays, a number of structural and functional parameters are accessible by MRI such as vascular density, vessel size index (VSI), cerebral blood flow (CBF), blood volume fraction (BVf), tumor oxygenation (tissue oxygen saturation (StO₂), cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO₂), as well as blood brain barrier integrity (using a dynamic contrast enhanced approach with the time-to-peak (TTP) and signal contrast enhancement). Some of these parameters have already been reported to feature other relevant metabolic indicators induced by *IDH1* mutation¹⁶. However, a multiparametric MRI approach is likely needed to allow establishing the modifications induced by *IDH1* mutation expression.

Preclinical studies are currently the only ways to highlight directly the features induced by the *IDH1* mutation *in vivo*, independently of other mutations and tumors characteristics. Previous preclinical studies have attempted to investigate the overexpression of *IDH1* mutation *in vivo*^{17,18} although to our knowledge, none with the original objective of specifically studying its pathophysiological expression by inducing such mutation in gliomas with the CRISPR/Cas9 method. This innovating genetic method enables to evaluate the only and basal expression of the *IDH1* mutation.

The aim of this preclinical study was thus to characterize *IDH1* mutation features induced by the expression of this mutation in U87 human derived GBM cell lines orthotopically implanted into rat brains through *in vivo* multiparametric MRI and MRS, along with *ex vivo* High Resolution Magic Angle Spinning spectroscopy (HR-MAS) and histological analysis.

EXPERIMENTAL

U87-MG human derived glioblastoma cell lines and validation of the expression of the *IDH1* mutation

Human derived glioblastoma cell lines U87 *IDH1*-mutated (*IDH1*+) and non *IDH1*-mutated (*IDH1*-) were purchased from the American Type Culture Collection® (ATCC®, HTB-14IG and HTB-14). The isogenic *IDH1*+ cell line was generated from the parental U-87MG (ATCC® HTB-14) cell line by the innovating CRISPR/Cas9 genetic method¹⁹. This is a heterozygous mutation expressing the c.395G>A mutant allele. Cells were cultured in Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher). Growth media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin–streptomycin and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air.

The validation of *IDH1* mutation expression was performed through Western blot analysis and detection of 2-HG in cells (**additional material**).

Animal models

IDH1+ and *IDH1*- cells were respectively implanted in 11 and 9 athymic male nude rats (200–250 g; RH-Foxn1^{nu}; Envigo Gannat, France) as previously described²⁰. Briefly, rats were anesthetized with a mixture of air and 1.5–2% isoflurane and placed in a stereotactic frame (900 M Kopf Instruments, Tujunga, CA). Thereafter, 5.10⁴ human derived glioblastoma cells, suspended in 5 μ L Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 1 $\times$), were injected into the right caudate nucleus²¹ with the needle of a 10- μ L Hamilton syringe. At the end of the experimental study period, anesthetized animals were sacrificed by decapitation after completion of MRI scans. Tumor samples were used for HR-MAS acquisitions (N=8 *IDH1*+ and N=7 *IDH1*-) and only part of these numbers tumors was used for histological analyses (N=4 *IDH1*+ and N=4 *IDH1*-) due to lack of samples. All protocols were approved by the Lorraine Ethics Committee N°66 according to Guidelines of Animal Care and Use (APAFIS no. 14056-2018031316365081). A schematic diagram of the experimental design is presented in **Figure 1a**.

In vivo MRI and MRS

Data acquisition and MRI processing

MRI was performed using a horizontal bore 4.7 T Biospec animal scanner (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany, Avance III console, Paravision 5.0.1) with a volume/surface cross-coil configuration. All rats (N=11 IDH1+ and N=9 IDH1-) underwent an MRI imaging session between day 15 and day 20 regardless of their respective tumor group. Anatomical imaging was first performed on all rats at day 15 post-graft with a T₂-weighted (T₂-w) image to assess tumor volume. Then, the order of rats imaged by to MRI and MRS was determined from based on tumor volumes (the largest to the smallest) measured at D15 in order to minimize tumors size variations between groups.²² The multiparametric MR protocol was applied once for each rats and involved acquired data (raw data) and derived maps were computed thereafter (parametric map, e.g. T₂-w, T₁ and T₂ map, vascular density, VSI, CBF, BVf, CMRO₂, StO₂, TTP, the percentage of signal enhancement) as presented in **Figure 1a**.

Overall acquisition time was 90 minutes. Spatial resolution of all parametric maps was defined from low-resolution graphic maps, e.g. CBF, VSI and vascular density maps. Details of sequences acquisition and MRI processing were described in **additional material**.

A region of interest (ROI) was manually delineated on the T₂-w images of each rat brain on the section with the most extensive tumor region. An additional peripheral tumor ROI was placed automatically at 2 pixels outside surrounding tumor delineation. For healthy tissue, a similar ROI to those applied for the tumor was positioned on the contralateral striatum. Examples of MRI maps and applied ROIs are provided in **Figure 1b**.

All MRI analyses, including cluster model, were performed using Medical software for Processing multi-Parametric images Pipelines (MP³) (<https://github.com/nifm-gin/MP3>).

Data acquisition and MRS processing

A single voxel proton MRS acquisition, a Point RESolved Spectroscopy (PRESS) sequence, was performed in order to quantify metabolite concentrations (TR/TE = 2500 /20 ms, 400 averages). Noted that the MRS acquisition was acquired in the middle of the MR protocol before the injection of the first contrast agent so as not to interfere in the quantification of metabolites as described in protocol chronogram in **Figure 1a**. The volume of interest was set at 3 × 3 × 3 mm³ and placed in the center of the tumor.

Quantification of *in vivo* proton MR spectra was described in **additional material**.

Ex vivo HR-MAS

Frozen tumor samples were introduced into a cold 4 mm zirconium rotor to which 30 µL of D₂O were added²³. All HR-MAS nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded (Bruker Avance III 500 spectrometer) operating at a proton frequency of 500 MHz. Details of acquisition and HR-MAS processing were described in **additional material**.

Histology

Tumor samples were fixed in 4% paraformaldehyde. Five-µm thick paraffin sections were performed with the using of following primary antibodies: Ki-67 (1:200; MIB1, Dako), anti-IDH1 R132H (1:70, DIA-H09, Dianova), along with Dako Autostainer Plus (Dako) and Flex+²⁴. Other sections were used for anti-CD31 (1:250, Abcam, [EPR17259] ab182981, Paris, France). All sections were reviewed by 2 observers (C.P. and A.C.) with an Olympus BX 51 microscope and quantitative analysis was performed with the Image J image-processing software (Version 1.48). *IDH1* expression was assessed in a binary manner: positive or negative marker.

Statistical analysis

All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, N.C.) and R version 3.6.1. The two-tailed significance level was set at p< 0.05. Characteristics of both tumor cell line groups are described as mean and standard deviation.

Due to the non-normality of the variables, characteristics of IDH1 tumors groups were compared using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests in case of multiple group comparisons. Paired tests were performed when needed.

From quantitative MRI parameters extraction, first, Wilk's Lambda test was used to determine which variable significantly contributed to the separation between the IDH1+ and IDH1- groups, independent of the glioblastoma volume. A subset of variables previously selected were finally introduced in multivariable LDA. Unsupervised model-based clustering analysis was performed on MRI maps including these variables parameters. Voxels in the tumor ROI were clustered using K-means method (squared Euclidean distance metric) and the optimal number of clusters was determined using the slope heuristic method²⁵.

RESULTS

Confirmation of expression and activity of the IDH1 mutation in the U87 IDH1- mutated cell lines

Expression of the *IDH1* mutation in IDH1+ cell lines was validated by Western blotting including the GAPDH expression control (additional file **Figure S1a**) and immunohistochemistry (additional file **Figure S1b**). Activity of this mutation was confirmed by a 2.25-fold higher intracellular 2-HG concentration in IDH1+ compared to IDH1- cell lines (0.09 ± 0.03 and 0.04 ± 0.01 mM respectively, $p=0.04$, additional file **Figure S1c**).

MRI features of the IDH1 mutation

Results of the univariate analysis are detailed in additional file (**Table S1**) and illustrated in **Figure 2**.

In univariate analysis, comparatively to IDH1- tumors, IDH1+ tumors exhibited lower tumor volume (9.63 ± 4.11 versus 18.30 ± 5.76 mm³, $p=0.01$) and a lower T₁ map value (4.03% decrease, $p=0.02$), as well as higher values for vascular density (223.78 ± 20.80 versus 181.86 ± 21.23 vessel/mm², $p<0.01$) and CBF (145.92 ± 29.82 versus 94.21 ± 34.58 mL/min/100g, $p=0.02$). With regard to vessel permeability illustrated in additional file **Figure S2**, IDH1+ tumors were characterized by a longer TTP (138.60 ± 19.20 versus 85.95 ± 13.96 seconds, $p<0.01$) as well as a significant decrease in contrast enhancement (68.76 ± 14.68 versus 84.43 ± 14.89 %, $p=0.04$). BVf, VSI, CMRO₂, StO₂ and T₂ values did not show any significant difference between both tumor types ($p>0.14$).

Peripheral tumor areas exhibited the same characteristics as those observed in the tumors. Although IDH1+ tumors showed a reduced VSI (8.07 ± 0.95 versus 9.34 ± 0.67 μm for IDH1- tumors, $p=0.04$), while no difference was observed for vessel density ($p=0.24$), CBF ($p=0.06$) and T₁ map ($p=0.06$).

Compared with contralateral normal brain, both tumor types exhibited a lower vessel density as well as higher BVf, CBF, VSI, StO₂, T₁, T₂ value and contrast enhancement ($p<0.05$). No difference was observed for CMRO₂ and TTP in the IDH1+ tumors ($p>0.05$), whereas there was a decrease in these parameters for IDH1- tumors compared to the contralateral normal brain ($p<0.05$).

LDA was performed to identify key features of the *IDH1* mutation. Two quantitative MR parameters were found statistically independent of tumor volume, namely vascular density and TTP. **Figure 3a** shows a clear separation of the two tumor types among these two MR characteristics. A model-based clustering analysis was also performed at the voxel level in order to illustrate voxels sharing the same MRI features according to these two parameters, the latter of which is depicted in **Figure 2b** and in additional file **Figure S3**.

IDH1 mutation metabolic profiles with MRS and HR-MAS

In vivo and *ex vivo* proton MR spectra of IDH1- and IDH1+ tumors and results of the quantification of detected metabolites are presented in **Figure 4**, **Table 1** and complete metabolite basis set are reported in **Table S2 (additional file)**. Results were consistent between *in vivo* MRS (**Figure 4a**) and *ex vivo* HR-MAS (**Figure 4b**) methods. In brief, IDH1+ tumors exhibited significant increased concentrations of N-acetylaspartate (NAA), phosphocreatine (PCR), taurine (TAU) and myo-inositol (M-INS), and a decreased concentration of glutathione (GSH) in comparison to IDH1- tumors ($p<0.05$). Total choline/NAA (tCHO/NAA) ratio was also significantly decreased with MRS ($p=0.04$) and not for HR-MAS method ($p=0.13$) for IDH1+ tumors. Of note, glutamate (GLU) significantly decreased in IDH1+ tumors only with the HR-MAS method ($p<0.01$). 2-HG was undetectable by both modalities.

Histopathological characterization of IDH1-mutant

No differential expression in proliferation was found between the IDH1+ and IDH1- tumors (54.47 ± 14.93 and 54.05 ± 2.92 % respectively, $p=0.58$), and non-significant of higher vascular density was observed for IDH1+ tumors (220.00 ± 38.10 versus 188.33 ± 13.74 vessel/mm², $p=0.38$).

When compared with healthy contralateral brain (<1% Ki-67 marker), tumors exhibited both higher proliferation ($p<0.01$) and lower vascular density with 390.00 ± 85.00 vessel/mm² for healthy tissue ($p<0.01$). Representative sections are illustrated in **Figure 5**.

DISCUSSION

In this multiparametric MRI and MRS study, the *IDH1* mutation, directly induced in the U87 cell lines, was associated with a higher vascular density and a lower permeability in brain tumors. These key features exhibited a statistical effect independent of tumor volume and may represent the first steps toward the understanding of physiopathological mechanisms induced by this mutation. Moreover, a lower aggressiveness metabolic profile was observed in both MRS and HR-MAS for IDH1+ tumors with, in particular lower tCho/NAA ratio and a lower GSH level.

The biological effects of the *IDH1* mutation remain controversial with regard to the neoangiogenesis pathway. Firstly, our MRI results showed that IDH1+ tumors exhibited higher vascular density but this difference not reaching statistical significance in our histological analyses obtained in a small number of samples. This vascular density parameter was not investigated in previous studies exploring the effect of the overexpression of the *IDH1* mutation in gliomas^{17,18}. Our results are nonetheless consistent with another multiparametric MRI study performed in humans with high grade gliomas²⁶, in which the microvessel type indicator was increased in IDH1+ tumors when compared to IDH1- counterparts. The higher vascular density observed in the present study is likely associated with a better cerebral metabolic rate of oxygen, although no difference was observed with our CMRO₂ measurements (3.16±1.68% for IDH1+ versus 2.38±1.09% for IDH1- tumors, p=0.25). Irrespectively, this better CMRO₂ in IDH+ tumors was also described in the study of Stadlbauer and al. for high-grade gliomas²⁶.

Secondly, a lower vessel permeability was observed herein in *IDH1*-mutant tumors. This permeability was studied through a semi-quantitative method, the DCE-MRI, with the observation of a longer TTP and a lower contrast enhancement in IDH1-mutant tumors. Such lower vessel permeability in IDH1-mutant tumors was also reported in the study by Lazovic et al. whereby IDH1+ tumors had slightly smaller areas of contrast enhancement compared with IDH1- gliomas¹⁷. In agreement with these results, Lu and al., in a study performed with DCE-MRI in human high-grade gliomas, also reported longer TTP for IDH1+ compared with IDH1- gliomas, suggestive of lower vascular permeability in IDH1+ tumors²⁷.

The combination of a higher vascular density with a lower permeability in IDH1-mutant tumors represents the key features of the *IDH1* mutation status in the current study, since they provide valuable information independent of tumor volume. Indeed, as observed in the cluster-based approach, a different tumor signature was observed between IDH1+ and IDH1- tumors and could prove useful in the assessment and monitoring of glioma. Another crucial point is that, conversely to other studies, the present results were obtained after the induction and not the over-expression of the *IDH1* mutation, ensuring that the observed differences are likely the result of the expression of this mutation. Given the above, we propose the hypothesis that the tumor vascular network of IDH1+ gliomas is more functional with better vascular density, lower vessel permeability along with lower peripheral vessel size index features than those observed in IDH1- tumors, and thereby close to the vasculature of healthy brain.

In addition, our study highlights a less aggressive metabolomic profile in IDH1+ tumors than in IDH1- tumors. This evaluation was performed through a non-invasive MRS method, corroborated by HR-MAS. It should be emphasized that in the current study, neither MRS nor HR-MAS was able to detect 2-HG. The most likely reason for this non-detection is the low concentration of 2-HG observed in our IDH1+ tumors (0.09 mM), compared to human gliomas, where 2-HG reaches 2–9 mM²⁸ with the NMR detection limit being in the millimolar range²⁹. Moreover, the main 2-HG resonances overlap with NAA and GLU signal in MRS spectra at the magnetic field used (4.7T) and are thus difficult to observe³⁰. For these reasons, a number of MRS studies have recently proposed using other metabolites than 2-HG for *IDH1* mutation detection^{31,32}. Although not all the metabolites are detected in MRS due to the low magnetic field applied, our results are thus in keeping with these previous studies by validating the concentration changes of other well-known IDH1+ specific metabolites^{9,10,31,32}. In particular, IDH1+ gliomas exhibited higher levels of NAA, TAU, PCR, M-INS and lower level of tCHO/NAA ratio which are considered as biomarkers of non-aggressive tumors^{33–37}.

Analysis of our histological data did not reveal any significant difference in vascularization between IDH1+ and IDH1- gliomas. This could be explained by the fact that typical MR parameters measure functional vessels only, whereas histology stains all vessels (functional and non-functional). Indeed, MRI vascular parameter assessment required the injection of contrast agents and/or flowing blood. Therefore, only perfused vessels were quantified. This lack of difference may also be the result of the small number of samples used in our histological analysis, partly due to the fact that most post-sacrifice samples were used for HR-MAS. *Ex vivo* tests, performed in IDH1+ gliomas, have nonetheless reported that 2-HG production is responsible for the formation of functional new blood vessels^{38,39}.

There are several limitations inherent to the current study. First, the tumor volumes observed in IDH1+ tumors were found to be almost half of those reported for IDH1- tumors. Although the IDH1+ tumors were scanned in first, this difference could influence other functional MR parameters such as those reflecting tumor vascularization. However, both vascular density and TTP were independent predictive factors of the *IDH1* mutation, irrespective of tumor volume. Secondly, the proposed animal model is based on human derived GBM cell lines, which is known to be poorly affected by the *IDH1* mutation⁴⁰. The choice of using U87 human derived GBM cell lines grafted into our animal models results to the fact that high growth tumor rates are expected, more adapted to realize such preclinical analyses. In addition, in comparison to the less well-characterized primary glioma stem-like cell lines, U87 human derived GBM cell lines are well defined and adapted to specifically study the effect of an induced mutation.

In summary, this study is the first to explore features induced directly by the expression of *IDH1* mutation in human derived GBM cell lines through a multiparametric MRI and MRS analysis. This mutation, crucial for therapeutic strategies in neuro-oncology, was found to lead to higher vascularity only seen in MRI, lower permeability and a less aggressive metabolic profile in tumors. These MRI features could prove particularly helpful to better elucidate the physiological mechanisms induced by this mutation. Further analyses are needed to better assess the features of this mutation through patient-derived models, involving lower-grade gliomas and multimodal imaging, including multi-tracer PET imaging.

REFERENCES

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
2. SongTao Q, Lei Y, Si G, et al. IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci*. 2012;103(2):269-273. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02134.x
3. Tran AN, Lai A, Li S, et al. Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro-Oncol*. 2014;16(3):414-420. doi:10.1093/neuonc/not198
4. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2010;465(7300):966. doi:10.1038/nature09132
5. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483(7390):474-478. doi:10.1038/nature10860
6. Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19(1):17-30. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014
7. Yang H, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(20):5562-5571. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1773
8. Masui K, Cavenee WK, Mischel PS. Cancer metabolism as a central driving force of glioma pathogenesis. *Brain Tumor Pathol*. 2016;33(3):161-168. doi:10.1007/s10014-016-0265-5
9. Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, et al. Metabolic reprogramming in mutant IDH1 glioma cells. *PloS One*. 2015;10(2):e0118781. doi:10.1371/journal.pone.0118781
10. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, et al. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3270-3275. doi:10.1073/pnas.1019393108
11. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology*. 2010;75(17):1560-1566. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f96282
12. Natsumeda M, Motohashi K, Igarashi H, et al. Reliable diagnosis of IDH-mutant glioblastoma by 2-hydroxyglutarate detection: a study by 3-T magnetic resonance spectroscopy. *Neurosurg Rev*. 2018;41(2):641-647. doi:10.1007/s10143-017-0908-y
13. Leather T, Jenkinson MD, Das K, Poptani H. Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of 2-Hydroxyglutarate as a Biomarker for IDH Mutation in Gliomas. *Metabolites*. 2017;7(2). doi:10.3390/metabo7020029
14. Crisi G, Filice S, Michiara M, Crafa P, Lana S. 2-Hydroxyglutarate Detection by Short Echo Time Magnetic Resonance Spectroscopy in Routine Imaging Study of Brain Glioma at 3.0 T. *J Comput Assist Tomogr*. 2018;42(3):469-474. doi:10.1097/RCT.0000000000000705
15. Natsumeda M, Igarashi H, Nomura T, et al. Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: a study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:158. doi:10.1186/s40478-014-0158-y
16. Emir UE, Larkin SJ, de Pennington N, et al. Noninvasive Quantification of 2-Hydroxyglutarate in Human Gliomas with IDH1 and IDH2 Mutations. *Cancer Res*. 2016;76(1):43-49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0934

17. Lazovic J, Soto H, Piccioni D, et al. Detection of 2-hydroxyglutaric acid in vivo by proton magnetic resonance spectroscopy in U87 glioma cells overexpressing isocitrate dehydrogenase-1 mutation. *Neuro-Oncol.* 2012;14(12):1465-1472. doi:10.1093/neuonc/nos258
18. Chaumeil MM, Larson PEZ, Yoshihara HAI, et al. Non-invasive in vivo assessment of IDH1 mutational status in glioma. *Nat Commun.* 2013;4:2429. doi:10.1038/ncomms3429
19. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science.* 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143
20. Toussaint M, Pinel S, Auger F, et al. Proton MR Spectroscopy and Diffusion MR Imaging Monitoring to Predict Tumor Response to Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastoma. *Theranostics.* 2017;7(2):436-451. doi:10.7150/thno.17218
21. Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, Ko LW. An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg.* 1980;53(6):808-815. doi:10.3171/jns.1980.53.6.0808
22. Lemasson B, Christen T, Tizon X, et al. Assessment of multiparametric MRI in a human glioma model to monitor cytotoxic and anti-angiogenic drug effects. *NMR Biomed.* 2011;24(5):473-482. doi:10.1002/nbm.1611
23. Čuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today.* 2010;15(15-16):610-621. doi:10.1016/j.drudis.2010.06.012
24. Pouget C, Hergalant S, Lardenois E, et al. Ki-67 and MCM6 labelling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, *IDH1* -mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathol.* Published online September 27, 2019:bpa.12788. doi:10.1111/bpa.12788
25. Baudry J-P, Maugis C, Michel B. Slope heuristics: overview and implementation. *Stat Comput.* 2012;22(2):455-470. doi:10.1007/s11222-011-9236-1
26. Stadlbauer A, Zimmermann M, Kitzwögerer M, et al. MR Imaging-derived Oxygen Metabolism and Neovascularization Characterization for Grading and *IDH* Gene Mutation Detection of Gliomas. *Radiology.* 2017;283(3):799-809. doi:10.1148/radiol.2016161422
27. Lu HT, Xing W, Zhang YW, Qin HP, Wu RH, Ding JL. [The value of DCE-MRI in predicting IDH gene mutation of high-grade gliomas]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2019;99(39):3105-3109. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.39.013
28. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med.* 2012;18(4):624-629. doi:10.1038/nm.2682
29. Bertolino N, Marchionni C, Ghielmetti F, et al. Accuracy of 2-hydroxyglutarate quantification by short-echo proton-MRS at 3 T: a phantom study. *Phys Medica PM Int J Devoted Appl Phys Med Biol Off J Ital Assoc Biomed Phys AIFB.* 2014;30(6):702-707. doi:10.1016/j.ejmp.2014.03.002
30. Tiwari V, Mashimo T, An Z, et al. In vivo MRS measurement of 2-hydroxyglutarate in patient-derived IDH-mutant xenograft mouse models versus glioma patients. *Magn Reson Med.* Published online January 30, 2020. doi:10.1002/mrm.28183
31. Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, et al. Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol.* 2012;107(1):197-205. doi:10.1007/s11060-011-0737-8
32. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, et al. Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. *Neuro-Oncol.* 2016;18(11):1559-1568. doi:10.1093/neuonc/now090
33. Gómez-Angelats M, Cidlowski JA. Cell volume control and signal transduction in apoptosis. *Toxicol Pathol.* 2002;30(5):541-551. doi:10.1080/01926230290105820
34. Gandía-González ML, Cerdán S, Barrios L, et al. Assessment of Overall Survival in Glioma Patients as Predicted by Metabolomic Criteria. *Front Oncol.* 2019;9:328. doi:10.3389/fonc.2019.00328
35. Sontheimer H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem.* 2008;105(2):287-295. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05301.x
36. Guo J, Yao C, Chen H, et al. The relationship between Cho/NAA and glioma metabolism: implementation for margin delineation of cerebral gliomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2012;154(8):1361-1370; discussion 1370. doi:10.1007/s00701-012-1418-x

37. Jalbert LE, Elkhaled A, Phillips JJ, et al. Metabolic Profiling of IDH Mutation and Malignant Progression in Infiltrating Glioma. *Sci Rep.* 2017;7:44792. doi:10.1038/srep44792
38. Seok J, Yoon S, Lee S, Jung JH, Lee YM. The oncometabolite d-2-hydroxyglutarate induces angiogenic activity through the vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling pathway. *Int J Oncol.* Published online November 27, 2018. doi:10.3892/ijo.2018.4649
39. Mao MJ, Leonardi DE. Vascular-endothelial response to IDH1 mutant fibrosarcoma secretome and metabolite: implications on cancer microenvironment. *Am J Cancer Res.* 2019;9(1):122-133.
40. Jiang H, Cui Y, Wang J, Lin S. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget.* 2017;8(12). doi:10.18632/oncotarget.13555

FIGURES

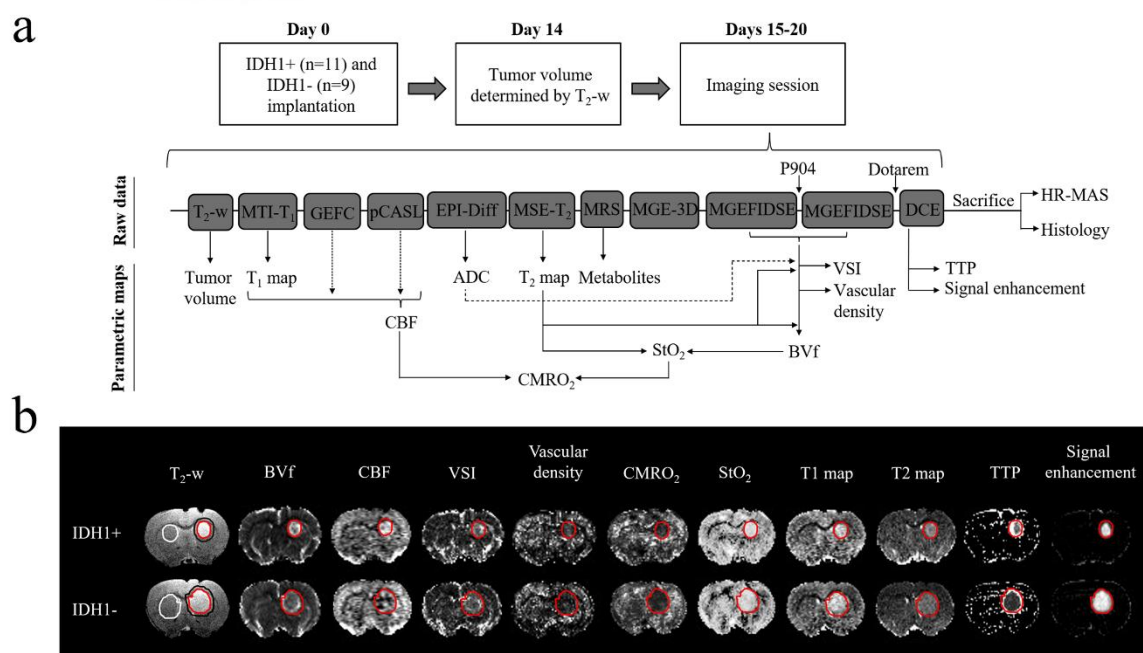


FIGURE 1 a) Flowchart depicting the experimental design. Twenty rats were orthotopically implanted with U87 human derived cell lines including 11 with the IDH1-mutant line. Fifteen days later, animal scan order was determined using T₂-w imaging according to tumor volume. The mri session involved measurement of 11 MRI parameters, namely T₂-w, T₁ and T₂ maps, vascular density, vessel size index (VSI), cerebral blood flow (CBF), blood volume fraction (BVf), cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO₂), tissue oxygen saturation (StO₂), time-to-peak (TTP) and the percentage of signal enhancement) and one mMRS sequence. B) representative maps of MRI parameters for IDH1+ and IDH1- GBM. In addition to anatomical T₂-w images, 10 MRI parameters were mapped (i.e. T₁ and T₂ maps, vascular density, VSI CBF, BVf, CMRO₂, StO₂, TTP and the percentage of signal enhancement). On the anatomical T₂-w, the red circle indicates the tumor ROI the white circle indicates the healthy tissue ROI while the black circle indicates the delineation of the peripheral tumor area ROI.

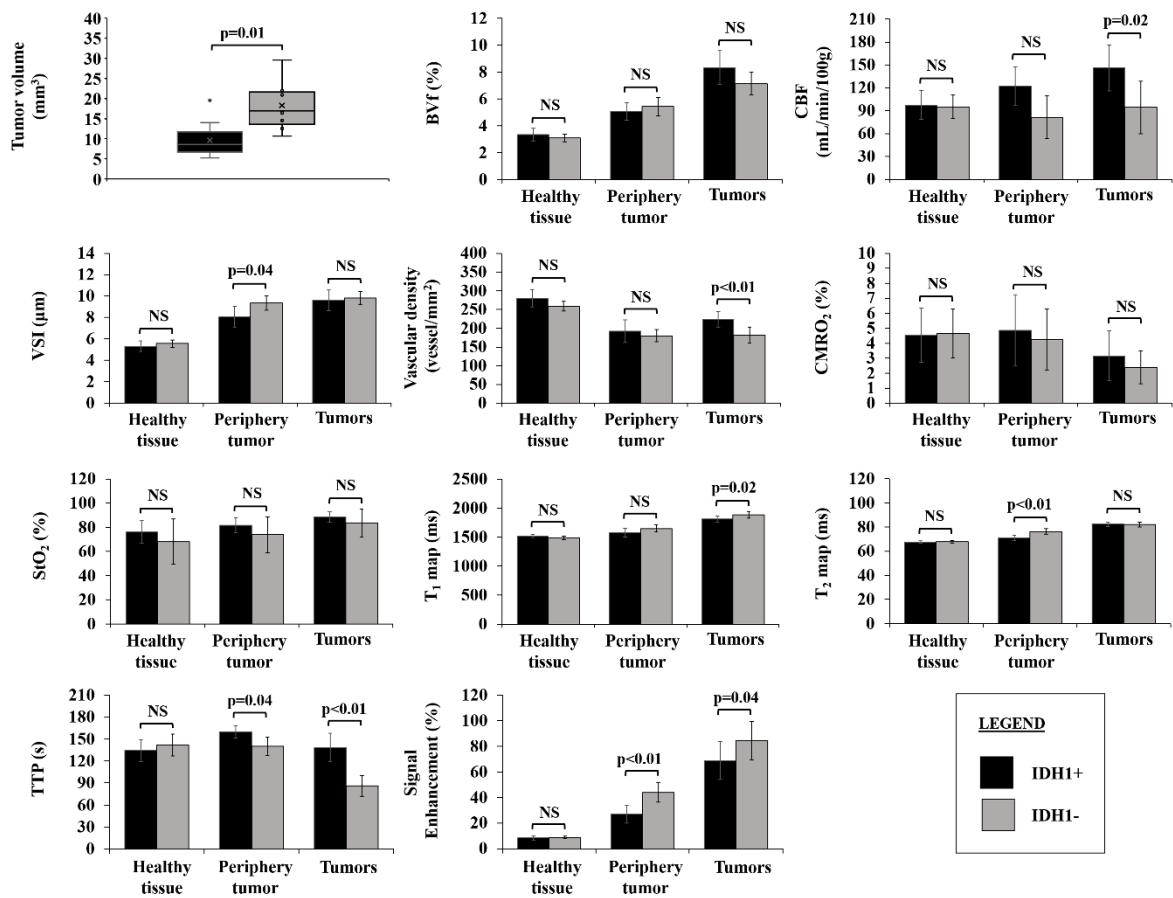


FIGURE 2 Histograms representative of univariate quantitative analysis of MRI parameters for IDH1+ (black bars) and IDH1- (grey bars) human derived tumors, periphery tumors areas and contralateral healthy tissue.

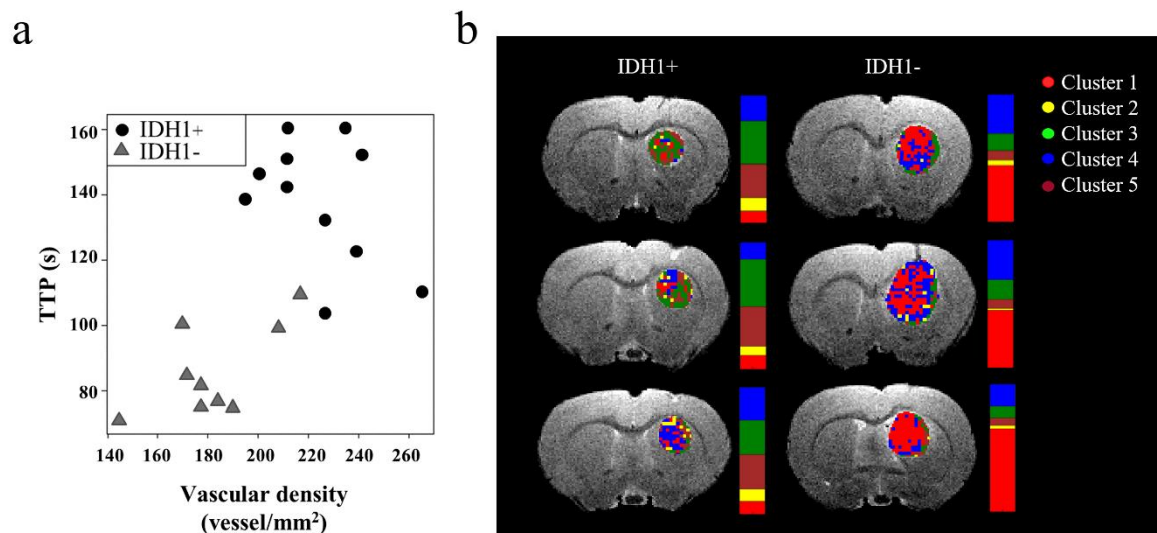


FIGURE 3 a) Graphic representation of the distribution of IDH1 human derived GBM according to the two independent MR parameters identified by LDA: vascular density and TTP. B) cluster distribution for vascular density and TTP of IDH1+ and IDH1- GBM. The IDH1+ were represented by a majority of clusters 3 and 4. By contrast, the IDH1- GBM were represented by cluster 1. The colored bars illustrate the cluster proportions in percentage within the ROI for the two tumor types. Details of the significance of each cluster are provided in FIGURE S3 (additional file).

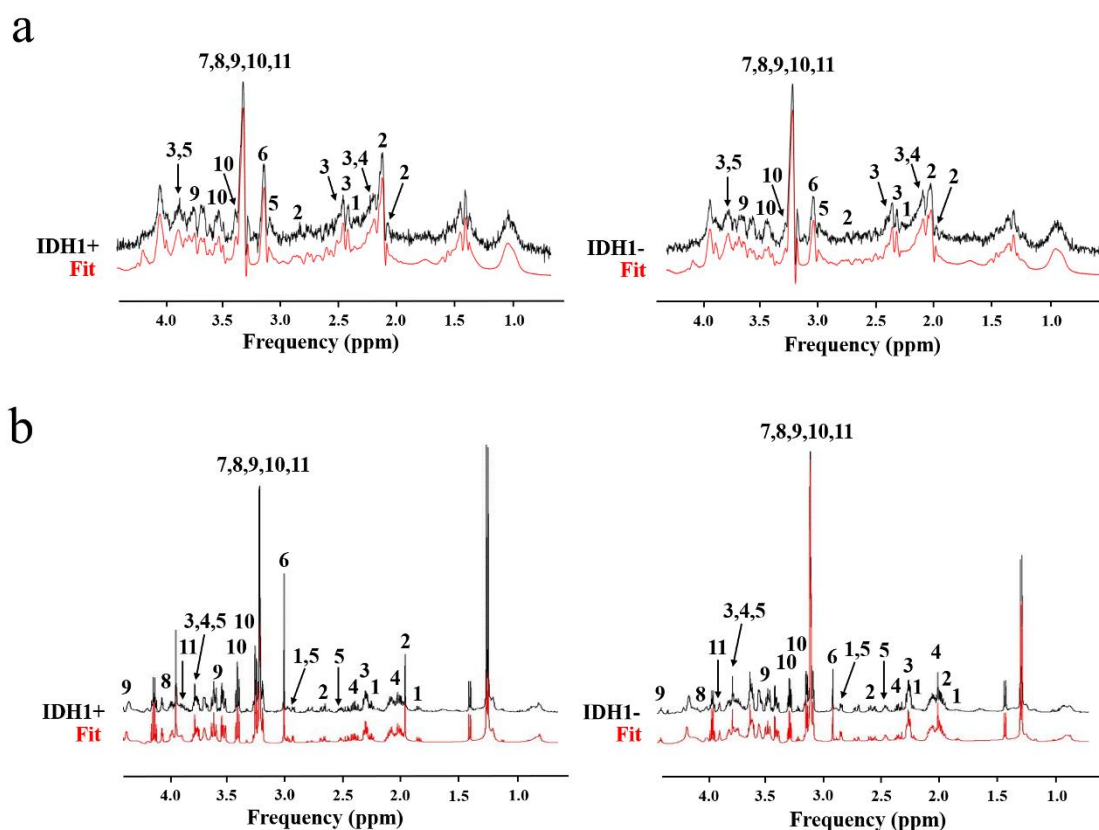


FIGURE 4 Spectra and fit of metabolic changes for IDH1 expression in human derived GBM according to their IDH1 status with a) *in-vivo* MRS and b) *ex-vivo* HR-MAS. Assignment: 1- gamma-aminobutyric acid, 2- N-acetylaspartate, 3- glutamate, 4- glutamine, 5- glutathione, 6- creatine+phosphocreatine, total choline [7- choline, 8- phosphocholine, 9- glycerophosphocholine], 10- taurine, 11- myo-inositol.

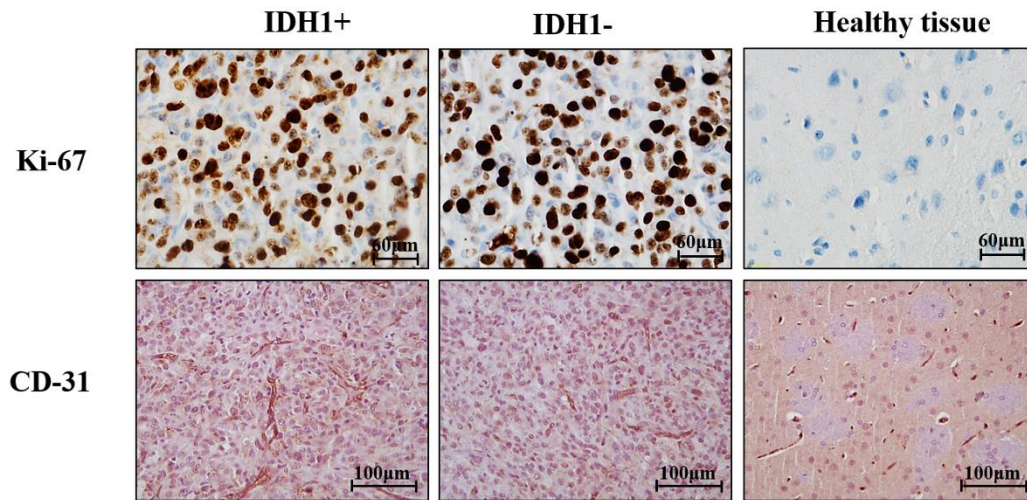


FIGURE 5 Representative sections of Ki67 proliferative index (upper panel, magnification x 40) and vessel density (lower panel, magnification x 20) in IDH1+ and IDH1- human derived GBM and in healthy rat brains. No differential expression in proliferation was found between IDH1+ and IDH1- GBM ($p=0.58$). Quantification of vascular density by the CD31 marker showed a tendency albeit non-significant for higher vascular density observed for IDH1+ GBM ($p=0.38$) and significantly lower vascularization in both GBM lines compared to healthy brain tissue ($p<0.01$).

TABLE

TABLE 1 Variations of metabolic changes for IDH1 expression in U87 human derived GBM cell lines with MRS *in vivo* and HR-MAS *ex vivo*. In BOLD, Mann-Whitney test with $p < 0.05$ significance

<i>In vivo</i> MRS		
Metabolites	IDH1+ versus IDH1-	Significance
GABA	↗	p=0.01
GLN	=	p=0.14
GLU	=	p=0.83
GLX	=	p=0.21
GSH	↘	p=0.05
PCR	↗	p=0.03
TAU	↗	p<0.01
M-INS	↗	p=0.01
tCHO	=	p=0.19
NAA	↗	p=0.01
tCHO/NAA	↘	p=0.04
<i>Ex vivo</i> HR-MAS		
Metabolites	IDH1+ versus IDH1-	Significance
GABA	=	p=0.22
GLN	=	p=0.49
GLU	↘	p<0.01
GLX	↘	p<0.01
GSH	↘	p<0.01
PCR	↗	p=0.03
TAU	↗	p=0.03
M-INS	↗	p=0.02
tCHO	=	p=0.20
NAA	↗	p=0.05
tCHO/NAA	=	p=0.13

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Validation of the expression of the IDH1 mutation in U87-MG human derived glioblastoma cell lines

Western blotting was performed with anti-IDH1 R132H antibody (1:1000, DIA-H09, Dianova), anti-GAPDH (1:1000, GTX100118, Genetex) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat-anti-mouse IgG secondary antibody (1:10 000, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). For analysis of 2-HG levels, confluent cells (IDH1+ and IDH1-) were collected (1.10^7) and 2-HG content in cell lysates were then determined using a 2-HG assay kit according to the manufacturer's instructions (BioVision Inc., San Francisco, CA).

Data acquisition and MRI processing

T₂-weighted (T₂-w) turbo rapid acquisition with refocused echoes (RARE) spin-echo sequence (repetition time (TR)/echo-time (TE) = 2200/36 ms, voxel size = $117 \times 117 \times 800 \mu\text{m}^3$, 19 slices, field of view (FOV) = $30 \times 30 \text{ mm}^2$) was performed to determine tumor volume.

Diffusion-weighted, spin-echo-EPI (EPI-diff) (TR = 2.2 s, TE = 33 ms, five slices, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$, NA = 8, matrix = 128×128 and voxel size = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$) was acquired. This sequence was applied 6 times : three without diffusion weighting and three times with diffusion weighting ($b = 800 \text{ s.mm}^{-1}$) in three orthogonal directions. ADC maps were automatically computed by Bruker as the mean of the ADCs observed in each of three orthogonal directions.

Multi-inversion time (MTI- T_1) scans acquired with flow-sensitive alternating inversion recovery sequence-echo planar *imaging* (FAIR-EPI) (TR/TE = 8273/26.5 ms, voxel size = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 slices, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$, 15 inversion times between 30 and 7000 ms) were used to compute the T_1 map. T_1 maps were obtained by fitting the following equation to the signal from each pixel using a Levenberg-Marquardt algorithm as described by Hirschler and al. ¹ :

$$M_z(TI) = M_0 \cdot (1 - 2\mathcal{K}e^{-TI/T_1})$$

where M_z (TI) is the MR signal collected at each TI, M_0 is the magnetization at thermal equilibrium, T_1 is the longitudinal relaxation time constant of tissue, and $\mathcal{K}$ is the inversion efficiency set to 1.

Gradient echo with flow compensation (GEFC) (TR/TE = 225/3.35 ms, voxel size = $117 \times 117 \times 1000 \mu\text{m}^3$, one slice placed on the carotids, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$) was performed to calculate the inversion efficacy (IE) of the arterial spin labeling ¹. The IE was derived from a complex reconstruction of the GEFC sequence as follows :

$$IE = \left| \frac{M_C - M_L}{2M_C} \right|$$

where M_C and M_L are the complex signals from the control and the label experiments, respectively. A region of interest was manually drawn on each carotid. The IE was obtained as the mean IE across both carotids.

Pseudo-continuous arterial spin labeling (pCASL) with an EPI readout was performed using the following parameters : labeling duration = 3 s, post-labeling delay = 400 ms, 50 pairs, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$, without background suppression and using a labeling pulses applied in the neck (at 2 cm from the isocenter). The pCASL was used with the inversion efficacy and the T_1 map (previously detailed) for determining the CBF as described by Hirschler and al. ¹. Briefly, M_0 was obtained from the control image intensity of the ASL experiment multiplied by $[1 - \exp(-TR/T_1^t)]^{-1}$ to correct for incomplete T_1 relaxation during the 3.6s TR. To calculate quantitative CBF maps, we assumed a single compartment and used the standard kinetic model developed by Buxton and al. ². Assuming that the arterial transit time is equal to the postlabeling delay, and that M_0^b , the magnetization of arterial blood at thermal equilibrium, may be approximated by M_0^t/λ , where M_0^t is the magnetization of tissue at thermal equilibrium and λ the blood-brain partition coefficient of water (0.9 mL/g) ³, we used the following equation pixel-by-pixel to quantify CBF (mL/100 g/min) ^{2,4,5} :

$$CBF = \frac{6000 \cdot \lambda \cdot \Delta M \cdot \exp(\omega/T_1^b)}{2 \cdot IE \cdot T_1^t \cdot M_0^t \cdot (1 - \exp(-\tau/T_1^t))}$$

where ΔM is the signal difference between control and label acquisitions averaged over repetitions; T_1^t is the apparent T_1 of tissue from the T_1 map; T_1^b is the longitudinal relaxation time of blood (2430 ms at 9.4 T) ⁶⁻⁸ and M_0^t is the control image intensity of the ASL experiment multiplied by $[1 - \exp(-TR/T_1^t)]^{-1}$ to correct for incomplete T_1 relaxation during the 3.6s TR.

Multiple spin-echo (MSE- T_2), (TR = 2000 ms, 26 spin-echoes, voxel size = $234 \times 234 \times 1 \mu\text{m}^3$, 5 slices, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$) images were acquired to obtain the T_2 map using a non-linear fitting algorithm. The T_2 map was used to calculate the oxygenation map (described below).

Multiple gradient echo 3D (MGE-3D) (TR = 100 ms, 15 gradient-echoes between 4 and 67ms, voxel size = $117 \times 117 \times 200 \mu\text{m}^3$, FOV = $30 \times 30 \times 0.52 \text{ mm}^3$) images were acquired to obtain the T_2^* map using a non-linear fitting algorithm. The T_2^* map was used to calculate the oxygenation map (described below).

Multiple gradient echo sampling of the free induction decay and spin echo (MGESFIDSE), (TR = 4000 ms, 34 gradient-echoes between 2.3 and 92.3ms, voxel size = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 slices, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$) were acquired before and after the injection of the ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (USPIO) P904 (133 $\mu\text{mol/kg}$ body weight; Guerbet, Roissy, France). Changes in transverse relaxation rates due to USPIO (ΔR_2^* and ΔR_2) were obtained from gradient-echo and spin-echo signals acquired before and after injection of USPIO⁹ these images enabled the calculation of VSI and vascular density (described below).

The dynamic contrast enhanced (DCE) sequence involved 25 images of T_1 -weighted (T_1 -w) spin-echo images (TR/TE = 800/4 ms, voxel size = $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$, 5 slices, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$). The acquisition time of 1 repetition is 15.2 sec. After the acquisition of four baseline images, a bolus of Gd-DOTA (200 $\mu\text{mol/kg}$; Dotarem, Guerbet, Roissy, France) was administered through the tail vein. Perfusion-related parameters as well as TTP and percentage of signal enhancement were measured on the DCE signal curve during the first 3 min post injection of the bolus¹⁰.

VSI and BVf maps were derived from the change in T_2 map and T_2^* values induced by injection of iron oxide particles¹¹. Briefly, BVf and VSI maps were estimated using the steady-state approach described by Tropres and al.⁹ using :

$$BVf = \frac{3}{4\pi\gamma\Delta\chi_{USPIO}B_0} (R_2^* \text{ after} - R_2^* \text{ before})$$

$$VSI = 0.425 \left(\frac{ADC}{\gamma\Delta\chi_{USPIO}B_0} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\Delta R_2^*}{\Delta R_2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

where $\gamma = 2.67502 \times 10^8 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, $B_0 = 4.7 \text{ T}$, and $\Delta\chi_{USPIO}$, the susceptibility difference between blood in the presence and absence of USPIO, was set to 0.1867×10^{-6} (CGS).

StO₂ maps were estimated using the multiparametric quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach¹². To correct for the macroscopic inhomogeneities of B_0 , the MGE-3D was spatially averaged. Thus, an MGE-3D dataset with a spatial resolution matching that of the T_2 map and the BVf maps was obtained. The following equation was fitted pixelwise to the MR signal decay collected beyond 10 ms echo time of the MGE-3D, $s(t)$:

$$s(t) = Cte \exp \left[-\frac{1}{T_2} t - BVf \gamma \frac{4}{3} \pi \Delta\chi_0 \text{Hct} (1 - StO_2) B_0 t \right]$$

where $\Delta\chi_0$, the difference between the magnetic susceptibilities of fully oxygenated and fully deoxygenated haemoglobin, was set to 0.264×10^{-6} (CGS) and using T_2 and BVf values from the corresponding maps. Cte is a proportionality constant and Hct set to 0.375.

CMRO₂ (oxygen consumption) was calculated voxel-wise using the following formula described by Bouvier and al.¹³ :

$$CMRO_2 = CaO_2 \times CBF \times (SaO_2 - StO_2)$$

where SaO₂, the arterial oxygen saturation and CaO₂, the arterial oxygen content, were set to 100% and 20.43 mL O₂/100 mL of blood, respectively.

Vascular density was computed as described by Lemasson et al.¹⁴ using the following formula :

$$Vascular \ density = 339 \frac{(\Delta R_2)^3}{(\Delta R_2^*)^2}$$

MRS processing

Quantification of *in vivo* proton MR spectra was achieved using LCmodel software (Version 1.6.¹⁵) with the following metabolites basis set : lactate, alanine, gamma-aminobutyric acid, N-acetylaspartate, glutamate, glutamine, glutathione, aspartate, total choline, phosphocholine, glycerophosphocholine, taurine, inositol, creatine, phosphocreatine. Water-Scaling was applied using the unsuppressed water reference signal to estimate absolute concentrations which is based on a theoretical water concentration. Reliability of the quantification was evaluated using the Cramer Rao lower bounds (CRLB) determined by the LCmodel algorithm with standard deviations (SD) $\leq 15\%$.

Data acquisition and ex vivo HR-MAS processing

A 4-mm ^1H - ^{13}C - ^{31}P HR-MAS probe head was used. Samples were spun at 4000 Hz. The 1D spectra were acquired with a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence to attenuate macromolecule and lipid resonances, synchronized with the spinning rate (interpulse delay 250 μs , total spin echo time 30 ms). The residual water signal was presaturated during the 1.7-s relaxation delay time. The total acquisition of one spectrum of 256 scans lasted 17 min.

Quantification was performed in the time domain using the QUEST procedure included in the jMRUI software package¹⁶ with the following metabolites basis set : lactate, alanine, gamma-aminobutyric acid, acetate, N-acetylaspartate, glutamate, glutamine, glutathione, hypotaurine, aspartate, phosphocreatine, phosphoethanolamine, total choline, glycerophosphocholine, phosphocholine, taurine, inositol, betaine, glycine, serine, ascorbate, succinate, valine, beta-hydroxybutyrate. QUEST is based on a metabolite database, which was simulated in this study using spin systems. The amplitude of metabolites calculated by QUEST was normalized to the total spectrum signal. Reliability of the quantification was assessed using the Cramer Rao lower bounds (CRLB) determined by the jMRUI algorithm with standard deviations (SD) $\leq 15\%$.

1. Hirschler L, Debacker CS, Voiron J, Köhler S, Warnking JM, Barbier EL. Interpulse phase corrections for unbalanced pseudo-continuous arterial spin labeling at high magnetic field. *Magn Reson Med*. 2018;79(3):1314-1324. doi:10.1002/mrm.26767
2. Buxton RB, Frank LR, Wong EC, Siewert B, Warach S, Edelman RR. A general kinetic model for quantitative perfusion imaging with arterial spin labeling. *Magn Reson Med*. 1998;40(3):383-396. doi:10.1002/mrm.1910400308
3. Herscovitch P, Raichle ME. What is the correct value for the brain--blood partition coefficient for water? *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 1985;5(1):65-69. doi:10.1038/jcbfm.1985.9
4. Alsop DC, Detre JA, Golay X, et al. Recommended implementation of arterial spin-labeled perfusion MRI for clinical applications: A consensus of the ISMRM perfusion study group and the European consortium for ASL in dementia. *Magn Reson Med*. 2015;73(1):102-116. doi:10.1002/mrm.25197
5. Debacker CS, Daoust A, Köhler S, Voiron J, Warnking JM, Barbier EL. Impact of tissue T1 on perfusion measurement with arterial spin labeling. *Magn Reson Med*. 2017;77(4):1656-1664. doi:10.1002/mrm.26255
6. Nasrallah FA, Lee ELQ, Chuang K-H. Optimization of flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) for perfusion functional MRI of rodent brain. *NMR Biomed*. 2012;25(11):1209-1216. doi:10.1002/nbm.2790
7. Dobre MC, Uğurbil K, Marjanska M. Determination of blood longitudinal relaxation time (T1) at high magnetic field strengths. *Magn Reson Imaging*. 2007;25(5):733-735. doi:10.1016/j.mri.2006.10.020
8. de Graaf RA, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Behar KL, Rothman DL. High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain *in vivo*. *Magn Reson Med*. 2006;56(2):386-394. doi:10.1002/mrm.20946
9. Troprès I, Pannetier N, Grand S, et al. Imaging the microvessel caliber and density: Principles and applications of microvascular MRI. *Magn Reson Med*. 2015;73(1):325-341. doi:10.1002/mrm.25396
10. Lemasson B, Bouchet A, Maisin C, et al. Multiparametric MRI as an early biomarker of individual therapy effects during concomitant treatment of brain tumours. *NMR Biomed*. 2015;28(9):1163-1173. doi:10.1002/nbm.3357
11. Troprès I, Grimault S, Vaeth A, et al. Vessel size imaging. *Magn Reson Med*. 2001;45(3):397-408. doi:10.1002/1522-2594(200103)45:3<397::aid-mrm1052>3.0.co;2-3

12. Christen T, Lemasson B, Pannetier N, et al. Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation. *NMR Biomed.* 2011;24(4):393-403. doi:10.1002/nbm.1603
13. Bouvier J, Detante O, Tahon F, et al. Reduced CMRO₂ and cerebrovascular reserve in patients with severe intracranial arterial stenosis: a combined multiparametric qBOLD oxygenation and BOLD fMRI study. *Hum Brain Mapp.* 2015;36(2):695-706. doi:10.1002/hbm.22657
14. Lemasson B, Valable S, Farion R, Krainik A, Rémy C, Barbier EL. In vivo imaging of vessel diameter, size, and density: a comparative study between MRI and histology. *Magn Reson Med.* 2013;69(1):18-26. doi:10.1002/mrm.24218
15. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 2001;14(4):260-264. doi:10.1002/nbm.698
16. Naressi A, Couturier C, Devos JM, et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *Magma N Y N.* 2001;12(2-3):141-152. doi:10.1007/bf02668096

SUPPLEMENTARY FILE

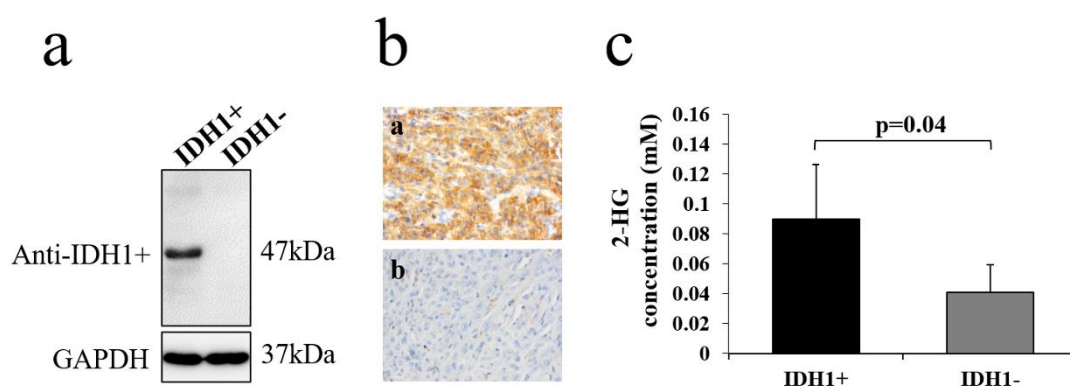


FIGURE S1 a) Western blot showing the protein expression level of the *IDH1* mutation in IDH1+ human derived GBM cell lines. In these cells, *IDH1* mutation expression was specifically recognized with an anti-IDH1 R132H antibody (arrow). b) Immunohistochemistry of anti-IDH1 R132H on U87 cell lines samples IDH1+ (a) and IDH1- (b) (magnification x40). c) Intracellular 2-HG concentration (mM) measured by spectrophotometer absorbance for IDH1+ and IDH1- cell lines.

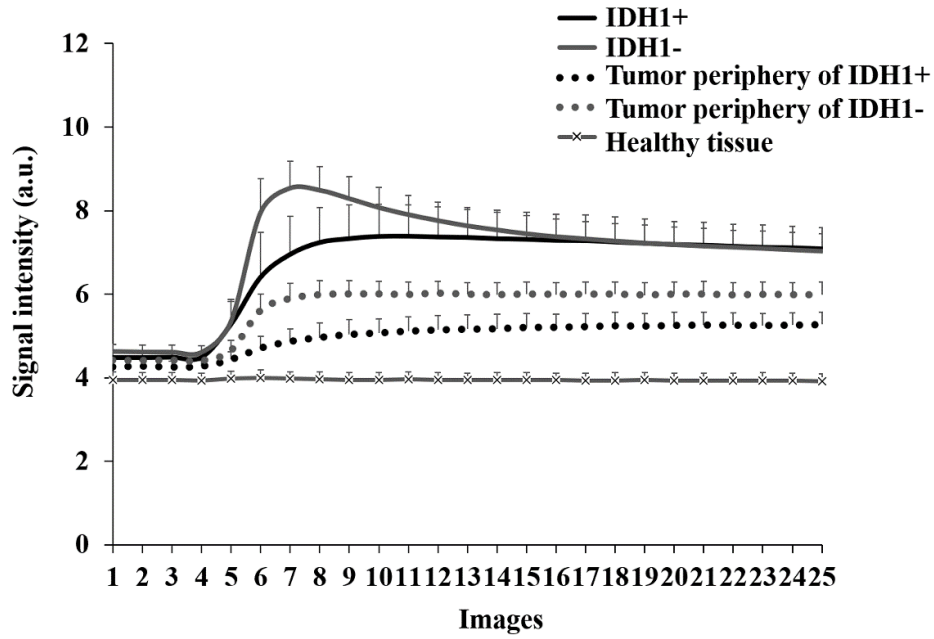


FIGURE S2 Relative signal intensity curves during contrast-enhanced (DCE) acquisition of IDH1+ tumor and periphery (black line and dots, respectively), IDH1- tumor and periphery (gray line and dots, respectively) and healthy tissue (gray line). Means $\pm$ standard deviation across each group and each ROI except for the healthy tissue (both groups are pooled).

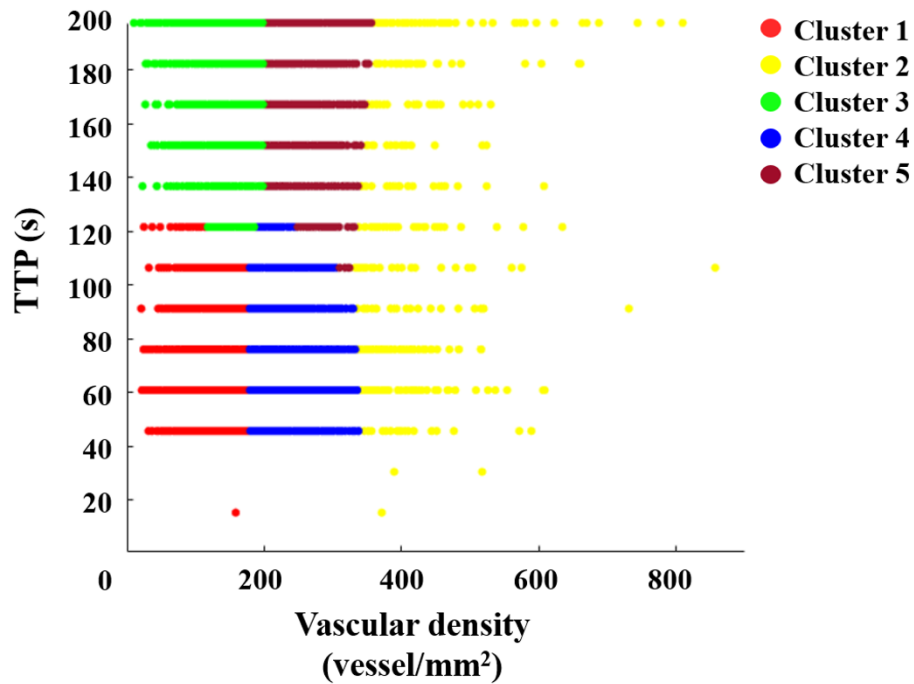


FIGURE S3 Representation of distribution for TTP and vascular density into each five cluster.

TABLE S1 Univariate quantitative analysis of MRI parameters for IDH1+ and IDH1- human derived tumors, periphery tumors areas and contralateral normal brain. Kruskal Wallis test for comparisons between tumor types (*), periphery of tumors types (†), IDH1+ tumors with contralateral normal brain (#) and IDH1- tumors with contralateral normal brain (§) with p<0.05.

	IDH1+			IDH1-			Significance
Tumor volume (mm ³)	9.63±4.11			18.30±5.76			p=0.01
MRI parameters	Tumor	Periphery tumor	Healthy tissue	Tumor	Periphery tumor	Healthy tissue	-
BVf (%)	8.33±1.26	5.07±0.66	3.30±0.48	7.14±0.86	5.44±0.67	3.10±0.28	#,§
CBF (mL/min/100g)	145.92±29.82	121.99±25.24	97.26±18.94	94.21±34.58	81.20±27.96	95.11±15.05	*,#,§
VSI (µm)	9.61±0.97	8.07±0.95	5.32±0.47	9.82±0.58	9.34±0.67	5.57±0.33	†,#,§
Vascular density (vessel/mm ²)	223.78±20.80	191.79±29.99	279.66±22.96	181.86±21.23	180.03±16.44	258.63±13.15	*,#,§
CMRO ₂ (%)	3.16±1.68	4.85±2.38	4.52±1.80	2.38±1.09	4.25±2.03	4.65±1.64	§
StO ₂ (%)	88.74±4.50	81.72±6.28	76.19±9.12	87.29±3.70	78.47±5.72	73.78±7.95	#,§
T ₁ map (ms)	1811.58±51.68	1576.29±74.66	1517.79±24.41	1887.57±57.59	1649.09±58.85	1486.95±27.06	*,#,§
T ₂ map (ms)	82.34±2.04	71.01±2.06	67.59±0.91	82.01±1.86	76.30±2.34	67.80±1.04	†,#,§
TTP (s)	138.60±19.20	159.85±8.39	134.42±14.92	85.95±13.96	139.94±12.69	141.84±14.74	*,†,§
Signal enhancement (%)	68.76±14.68	27.04±7.10	8.49±1.61	84.43±14.89	43.76±7.56	8.72±1.09	*,†,#,§

TABLE S2 Quantification and variations of basis set metabolic changes for IDH1 expression in U87 human derived GBM cell lines with MRS *in vivo* and HR-MAS *ex vivo*. In BOLD, Mann-Whitney test with $p < 0.05$ significance.

<i>In vivo</i> MRS (mM/Kg wet weight)				
Metabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ vs IDH1-	Significance
GABA	2.23±0.51	1.18±0.75	↗	p=0.01
GLN	5.83±0.60	4.93±1.29	=	p=0.14
GLU	17.07±1.16	16.79±1.29	=	p=0.83
GLX	22.90±1.28	21.71±2.12	=	p=0.21
GSH	3.03±0.27	3.40±0.47	↘	p=0.05
PCR	5.04±1.03	3.21±1.43	↗	p=0.03
TAU	8.81±1.32	6.25±1.33	↗	p<0.01
PCHO	3.23±1.19	2.61±0.88	↗	p=0.03
M-INS	5.97±0.45	4.80±0.81	↗	p=0.01
GPC	3.48±0.68	3.17±0.88	=	p=0.58
tCHO	5.79±0.79	6.71±1.57	=	p=0.19
NAA	10.94±1.21	7.77±2.09	↗	p=0.01
tCHO/NAA	0.54±0.12	0.96±0.42	↘	p=0.04
ASP	6.96±1.01	6.15±0.77	=	p=0.11
ALA	1.84±0.69	1.86±0.59	=	p=0.92
LAC	4.43±1.28	3.08±1.08	↗	p=0.05
Cr	5.52±0.61	4.79±0.61	↗	p=0.04
<i>Ex vivo</i> HR-MAS (a.u)				
Metabolites	IDH1+	IDH1-	IDH1+ vs IDH1-	Significance
GABA	5.17E-03±1.25E-03	3.91E-03±1.26E-03	=	p=0.22
GLN	1.12E-02±2.21E-03	1.01E-02 ±3.55E-03	=	p=0.49
GLU	3.37E-02±1.84E-03	4.75E-02±4.24E-03	↘	p<0.01
GLX	4.49E-02±4.45E-03	5.76E-02±5.17E-03	↘	p<0.01
GSH	5.82E-03±5.78E-04	8.94E-03±1.02E-03	↘	p<0.01
PCR	1.73E-02 ±3.46E-03	1.03E-02 ±3.90E-03	↗	p=0.03
TAU	2.37E-02 ±3.66E-03	1.78E-02 ±3.02E-03	↗	p=0.03
PCHO	7.00E-03 ±9.64E-04	1.19E-02 ±2.57E-03	=	p=0.49
M-INS	1.73E-02 ±2.51E-03	1.35E-02 ±6.11E-04	↗	p=0.02
GPC	1.56E-02 ±3.48E-03	1.63E-02 ±3.29E-03	=	p=0.90
tCHO	2.82E-02 ±7.47E-03	2.27E-02 ±6.90E-03	=	p=0.20
NAA	1.00E-02±4.45E-03	3.91E-03 ±3.75E-03	↗	p=0.05
tCHO/NAA	21.91±17.34	3.62±2.80	=	p=0.12
ASP	5.88E-03±1.60E-03	7.75E-03 ±2.34E-03	=	p=0.25
ALA	8.75E-03±1.12E-03	8.68E-03 ±9.02E-04	=	p=0.66
LAC	7.76E-02±4.53E-03	6.20E-02±1.27E-02	=	p=0.12
ACE	4.35E-04±1.35E-04	1.23E-04 ±1.43E-04	↗	p=0.02
BETAINE	2.61E-03 ±4.32E-04	2.20E-03 ±1.63E-04	↗	p=0.03
SUCCINATE	3.92E-04 ±1.42E-04	6.69E-04 ±1.24E-04	↘	p=0.03
VAL	2.84E-04 ±1.06E-04	4.74E-04 ±1.47E-04	=	p=0.12
B-OH	1.68E-03 ±1.75E-04	2.02E-03 ±3.46E-04	=	p=0.22
GLY	4.82E-03 ±5.33E-04	5.28E-03 ±7.59E-04	=	p=0.58
SER	3.35E-04 ±4.18E-04	1.49E-03 ±1.27E-03	=	p=0.19
ASC	1.51E-03 ±9.29E-04	1.33E-04 ±2.28E-04	↗	p<0.01
PE	6.43E-03±9.28E-04	5.23E-03 ±2.25E-03	=	p=0.22
HYPO	8.46E-04±4.20E-04	1.75E-03 ±5.17E-04	↘	p=0.04

L'ARTICLE N°2

Multitracer PET imaging of the IDH1 mutation in glioma: a translational *in vitro* and *in vivo* characterization

Alexandra Clément ^{#,1,2}, Timothee Zaragori ^{1,2}, Romain Filosa¹, Olga Ovdiichuk¹, Marine Beaumont ^{2,3}, Charlotte Collet ^{1,2}, Emilie Roeder¹, Fatiha Maskali¹, Muriel Barberi-Heyob⁴, Celso Pouget⁵, Matthieu Doyen^{1,2}, Antoine Verger^{1,2,6}

¹Nancyclotep Molecular and Experimental Imaging Platform, CHRU-Nancy, France

²Lorraine University, INSERM, IADI UMR 1254, Nancy, France

³Lorraine University, CIC-IT UMR 1433, CHRU-Nancy, France

⁴Lorraine University, CNRS, CRAN UMR 7039, Nancy, France

⁵Department of Pathology, CHRU-Nancy, France

⁶Department of Nuclear Medicine, CHRU-Nancy, France

Correspondence: [#] Alexandra Clément, Nancyclotep Molecular and Experimental Imaging Platform, CHRU-Nancy, France, 05 rue du Morvan 54500 Vandoeuvre-Les-Nancy, PHONE: +33 03 83 15 78 11, E-MAIL: a.clement@nancyclotep.com

Shortned title: Multitracer PET imaging of the IDH1 mutation in preclinical model of glioma

Category of manuscript: Original article

Orcid: Alexandra CLEMENT  [0000-0003-2982-3070](https://orcid.org/0000-0003-2982-3070)

ABSTRACT

Purpose: This translational study explores multi-tracer PET imaging for non-invasive characterization of the IDH1 mutation, a good prognostic factor, in glioma.

Procedures: U87 human high-grade glioma (HGG) isogenic cell lines with/without the IDH1 mutation (CRISP/Cas9 method) were stereotactically grafted into rats brains, and examined, *in vitro* and *in vivo*, after tumor outgrowth. PET imaging sessions, with radiotracers for glycolytic metabolism (¹⁸F]FDG), amino acid metabolism (¹⁸F]FDopa, [¹¹C]MET, [¹⁸F]FET), angiogenesis (⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂) and inflammation (¹⁸F]DPA-714), were each performed over consecutive 4 day periods. The *in vitro* uptake was expressed as percent/million cells. For each radiotracer examined *in vivo*, static analyses included the maximal and mean tumor-to-background ratio (TBR_{max} and TBR_{mean}) and metabolic tumor volume (MTV). Dynamic analyses included time-to-peak and slope curve parameters.

Results: *In vitro*, IDH1+ cells, which express the IDH1 mutation, had lower [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714 uptake compared to IDH1- cells (p≤0.04). These results were confirmed *in vivo* with lower [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ uptake (7.19 versus 9.70 for TBR_{max}, p=0.01) and a more pronounced decrease in the [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714 slopes curves (respectively -0.15 versus 0.02 and -0.18 versus 0.23, p=0.04) for IDH1+ tumors. In multivariate analysis, the combination of TBR_{max} and slope of [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ or [¹⁸F]DPA-714 provided the best diagnostic performance to discriminate between the two cell lines (AUC of 0.81, p<0.01).

Conclusion: [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714, reflect the lower aggressive profile of IDH+ tumors, and are two independent PET tracers of choice for non-invasive characterization of the IDH1 mutation in HGG that are amenable to further translational studies in the clinic.

KEYWORDS: IDH mutation, PET, gliomas, [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂, [¹⁸F]DPA-714

INTRODUCTION

The isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation has been integrated in the 2016 revision of the world health organization (WHO) classification of tumors of the central nervous system (CNS). this molecular alteration is a significant biomarker in the diagnostic and prognostic evaluation of gliomas (Louis et al. 2016). Gliomas expressing the IDH1 mutation are associated with better chemo- and radiotherapy responses and longer patient survival periods [2, 3, 13].

Whilst several studies have used magnetic resonance imaging (MRI) in an attempt to non-invasively characterize the IDH1 mutation in gliomas ((Pope et al. 2012; Chaumeil et al. 2013; Emir et al. 2016; Nagashima et al. 2016; Lu et al. 2019; Tiwari et al. 2020 Jan 30), the potential for positron emission tomography (PET) as a complementary imaging tool is not well-characterized by exploring the metabolic aspect of gliomas (Albert et al. 2016). The diagnostic information acquired with 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG), the gold standard in clinical PET tumor imaging, is inconsistent and poorly suited to neuro-oncology applications owing to its high physiologic uptake by healthy brain tissue. Amino acid PET tracers, such as [¹¹C]-methionine ([¹¹C]MET), 6-[¹⁸F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine ([¹⁸F]FDopa) and O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine ([¹⁸F]FET) however bind to the L-type amino acid transporter-1 (LAT-1) and exhibit reduced uptake in healthy brain tissue, thereby enabling more accurate characterization of gliomas. (Chen 2007). The correlation between IDH1 mutational status and amino acid PET parameters nevertheless remains unclear and heterogeneous (Verger, Taieb, et al. 2017). New generation radiotracers were therefore developed to better characterize other glioma properties by PET imaging. Notable among these are, the angiogenesis PET marker [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ a ligand of the $\alpha_v\beta_3$ integrin which is expressed in glioma cells and in neovascular endothelial cells (Schnell et al. 2008; Li et al. 2014; Frosina 2016) and the tumor inflammation PET marker [¹⁸F]DPA-714, a ligand of the translocator protein (TSPO) which is also expressed in glioma cells (Miettinen et al. 1995; Roncaroli et al. 2016). To the best of our knowledge, no study has to date combined multitracers static and dynamic PET acquisitions to investigate the metabolic changes induced by expression of the IDH1 mutation in gliomas.

Currently, preclinical studies present the sole means of investigating the *IDH1* mutation phenotype *in vivo* independently of other mutations and tumor characteristics. Previous preclinical studies have attempted to investigate the overexpression of the *IDH1* mutation *in vivo* (Bralten et al. 2011; Lazovic et al. 2012; Shi et al. 2015; Shi et al. 2016) although to the best of our knowledge, none with the original objective of specifically investigating its pathophysiological expression by introducing the mutation in the well characterized U87 human HGG cell line using CRISPR/Cas9. This innovative genetic approach allows to evaluate the isolated effects of basal expression of the *IDH1* mutation.

The aim of our current study is to characterize metabolic changes induced by expression of the IDH mutation in U87 human derived HGG cell lines *in vitro*, and *in vivo* in a rat orthograft model, using multitracers PET imaging specific for glycolysis metabolism ([¹⁸F]FDG), amino-acid metabolism ([¹⁸F]FDopa, [¹¹C]MET and [¹⁸F]FET), angiogenesis [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and tumor inflammation ([¹⁸F]DPA-714).

MATERIALS AND METHODS

U87-MG human derived HGG cell lines

U87 human derived HGG cell lines *IDH1*-mutated (IDH1+) and non *IDH1*-mutated (IDH1-) were purchased from the American Type Culture Collection® (ATCC, HTB-14IG and HTB-14). The two cells lines were cultured under standard conditions as previously described (unpublished manuscript, A Clément *et al.*).

Animal models

IDH1+ and IDH1- cells (5x10⁴ cells per animal) were implanted into the brain right caudate nucleus of athymic male nude rats (200-250 g; RH-Foxn1^{rnu}; Envigo Gannat, France) as previously (unpublished manuscript, A Clément *et al.*). After imaging some of the anesthetized animals were sacrificed by decapitation for histological analysis (N=20 IDH1+ and N=14 IDH1-). All protocols were approved by the Lorraine Ethics Committee N°66 in accordance with the Guidelines of Animal Care and Use (APAFIS no. 14056-2018031316365081).

Radiochemistry

[¹⁸F]FDG (FLUCIS®) and [¹⁸F]FDOPA (DOPACIS®) were purchased from Curium (Nancy, FRANCE). [¹⁸F]FET was prepared from the O-(2-tosyloxyethyl)-N-trityl-tyrosine tert-butylester (TET) by ¹⁸F-fluorine nucleophilic substitution on the All In One® (AIO®) (Trasis) synthesizer (Otabashi et al. 2017). [¹¹C]MET radiotracer was obtained by [¹¹C]methylation of L-homocysteine on AIO® (Trasis, Belgium) synthesizer as previously described (Vergote et al. 2017). [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ was prepared on the mAIO® (Trasis, Belgium) synthesizer using the similar, previously described procedure for [⁶⁸Ga]NODAGA-RGDyK (Isal et al. 2018). [¹⁸F]DPA-714

radiosynthesis was implemented on the AIO[®] synthesizer to produce [¹⁸F]DPA-714 by nucleophilic substitution of the tosylated precursor OTs-DPA-714 (Pharmasynth, Estonia), as previously described (Kuhnast et al. 2012).

In vitro study

The IDH1+ and IDH1- U87 human derived HGG cells were resuspended in HBSS at a concentration of 2×10^5 /mL, and incubated (37°C, 5% CO₂/95% air) with 1MBq/mL of radiotracer for different lengths of time depending on the half-life of the radio-isotope (30, 60 and 120min for all fluor-18 and gallium-68 labelled-radiotracers and 10, 20 and 30min for carbon-11). Tracer uptake was stopped by the addition of ice-cold phosphate-buffered-saline (PBS). The cell substrate was then washed twice in cold PBS and resuspended in 1ml of cold HBSS. The radioactivity, expressed as counts per minute and decay corrected for each radiotracer, was measured using a calibrated gamma counter (Wizard, PerkinElmer®, France). The cellular uptake measurement, expressed as uptake per million cells, was determined using trypan blue. Individual radiotracer experiments were performed in duplicate for each of the three time points examined.

In vivo study

PET recordings were obtained with a camera dedicated to small animal studies (Inveon, Siemens Preclinical Solutions®, Knoxville, USA). Two sets of rat brain acquisitions were performed, static acquisitions only for the first set of rats and dynamic acquisitions (and further reconstructed static acquisitions) for the second set of rats.

The flowchart *in vivo* procedure is detailed in **Fig.1**.

For static acquisitions, a 30 min PET scan was performed with [¹⁸F]FDG (injected activity of 74MBq) at 60 min post-injection (p-i) (Belloli et al. 2013), [¹⁸F]FDopa and [¹⁸F]FET (30MBq) at 30 min p-i (Verhoeven et al. 2019), and [¹¹C]MET (30MBq) at 20 min p-i, as recommended in the literature (Watabe et al. 2017). For the other [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714 radiotracers, a 20 min PET scan was acquired at 60 min p-i with an injected activity of 30MBq (Isal et al. 2018; Tang et al. 2019). All PET images were reconstructed using the ordered-subsets expectation maximization 3D algorithm (OSEM3D, 4 iterations, 16 subsets, zoom 1) together with scatter and attenuation corrections based on transmission scan using a ⁵⁷Co source measurement. The final voxel size was 0.77×0.77×0.79 mm³.

The dynamic acquisitions were started a few seconds prior to the tracer injection with a 120 min acquisition for all fluor-18 and gallium-68 labelled-radiotracers, and all acquired PET data were subsequently timely reconstructed in 27 consecutive frames (i.e., 5 frames x 120-s, 22 frames x 300-s). For [¹¹C]MET, a 60 min acquisition was performed with secondary 15 frames timely reconstructed (i.e., 5 frames x 120-s, 10 frames x 300-s) to take into account the limited half-life of the carbon-11 radio-isotope (20 min). The reconstructed parameters were similar to those reported for static acquisitions.

Anatomical images were obtained by MRI which was performed on a 3Tesla scanner (Prisma, Siemens Healthineers®, Erlangen, Germany) with an 8-channel volume coil (Rapid Biomedical GmbH®, Rimpf, Germany). T₂-weighted (T₂-w) anatomical images were acquired using a Turbo Spin-Echo sequence (repetition time (TR)/echo-time (TE)=2500/61 ms, voxel size=255 × 255×1000 μm³, 24 slices, field of view (FOV)=49×49 mm², 8 averages) to define tumor volumes on the 15th day post-graft (p-g).

Volumes of interest (VOIs) were determined from fused static PET and PET/T₂-w MRI images with dedicated software (Inveon Research Workplace 4.1, Siemens®, Knoxville, USA). Tumors VOIs were deduced from metabolic tumor volumes defined in the literature or from our own experience by applying a factor of 0.8, relative to healthy brain tissue, for [¹⁸F]FDG, 1.3 for amino acid radiotracers (Law et al. 2019), and 1.8 for [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714. The normal brain reference was defined as a symmetrical VOI in contralateral healthy brain.

Briefly, tumor-to-normal-brain ratios (TBR_{mean} and TBR_{max}) were computed from static images and two dynamic parameters were determined from fitted time-activity curves: the time-to-peak (TTP) and the slope. Further calculation and determination of MRI and PET parameters are detailed in **supplementary material (see ESM)**.

Immunohistochemistry

Tumor samples were fixed in 4% paraformaldehyde. Five-μm paraffin sections were incubated in 10mM sodium citrate buffer (pH 6) for 20 minutes at 97°C for dewaxing and antigen retrieval. The following primary antibodies were used: anti-GLUT-1 (1:600, NB-22-3291, Neo Biotech), anti-CD-98 (anti-LAT-1) (1:500, LS-C4853000, LSBio), anti-αβ3 (1:250, LS-C15964, LSBio) and anti-TSPO (1:500, 119-13538, RayBiotech), along with Dako Autostainer Plus (Dako) and Flex+. The analysis procedure is detailed in supplementary material (see ESM).

Statistical analyses

All analyses were performed using SPSS (IBM, SPSS Statistics version 25.0) and R version 3.6.1. The two-tailed significance level was set at $p < 0.05$. The statistics tests were detailed in **supplementary material (see ESM)**.

RESULTS

In vitro study

Fig. 2 summarizes results of the *in vitro* study. There was no difference in cell uptake activity between IDH1+ and IDH1- tumors for [^{18}F]FDG and the three amino acid tracers ($p > 0.21$). In contrast, IDH1+ cells exhibited significantly lower uptakes of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ and [^{18}F]DPA-714 at all time points of measurements when compared to IDH1- cells (respectively 0.14, 0.19, and 0.24% of uptake/million cells at 30, 60, 120 min versus 0.37, 0.40 and 0.45%, $p < 0.01$ and 0.71, 0.57, and 0.53% of uptake/million cells at 30, 60, 120 min versus 1.40, 1.58 and 1.81% of uptake/million cells, $p < 0.01$).

In vivo study

Rat population

For static acquisitions, we induced 28 IDH1+ and 29 IDH1- tumors in rats' brains. For dynamic acquisitions (and further reconstructed static and dynamic acquisitions), 22 rats with IDH1+ and 21 rats with IDH1- tumors, were imaged. A detailed Table (**Table S1**) of available imaging session samples for each radiotracer with both static and dynamic datasets is presented in **supplementary files (see ESM)**.

MRI and PET data analyses

Univariate analyses

IDH1+ and IDH1- tumors grew to similar volumes, 23 [14.4; 66.25] mm 3 versus 28 [18; 77.57] mm 3 , respectively ($p = 0.29$). PET results are summarized in **Table 1**. No significant difference between IDH1+ and IDH1- tumors was observed for [^{18}F]FDG and the three amino acid tracers with both static and dynamic acquisitions ($p \geq 0.26$). When compared to IDH1- tumors, IDH1+ tumors were however characterized by a significantly decreased [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ TBR $_{\text{mean}}$ (6.35 [6.06; 6.61] versus 7.46 [6.59; 7.84], $p = 0.04$) and TBR $_{\text{max}}$ (7.19 [6.46; 8.00] versus 9.70 [8.34; 11.40], $p = 0.01$). In addition, the IDH1+ tumor characteristics were associated with significantly decreased slope for [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ and [^{18}F]DPA-714 radiotracers (respectively -0.15 [-0.17; -0.11] versus 0.02 [-0.02; 0.07], $p = 0.04$ and -0.18 [-0.22; -0.16] versus 0.23 [0.09; 0.29], $p = 0.04$). Representative tumors imaged with MRI and multitracer PET as well as the mean time-activity curves for each radiotracers are shown in **Fig. 3** and **suppl Fig. S1 (see ESM)**, respectively.

Multivariate analysis

The multivariate analysis showed that the combination of TBR $_{\text{max}}$ and slope of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ as well as the slope of [^{18}F]DPA-714 provided the best diagnostic performance to discriminate between the two types of tumors (AUC of 0.81, $p < 0.01$). Results of this multivariate analysis as well as the ROC curve are shown in **suppl. Table S2**, and **Fig. 4**, respectively.

DICE

All exploitable results from the DICE coefficients ($N \geq 5$ for direct comparisons between the two radiotracers) are reported in **suppl. Table S3**.

Ex vivo analyses

There were no significant differences for GLUT-1, with hotspot median values of 28.00 [18.00; 38.00] for IDH1+ ($N = 9$) and 32.00 [26.75; 35.75] for IDH1- ($N = 10$) ($p = 0.54$), for LAT-1 staining with an average score of 2 for both tumors types ($N = 7$ IDH1+ and $N = 11$ IDH1-) ($p = 0.55$), for $\alpha v \beta 3$ integrin staining with a median number of vascular section equal at 22.50 [15.75; 22.50] and 19.50 [14.50; 22.25] for IDH1+ ($N = 8$) and IDH1- ($N = 8$) respectively ($p = 0.44$), and for the TSPO receptors with an average score of 1 for both types of tumors ($N = 10$ IDH1+ and $N = 13$ IDH1-, $p = 0.63$).

DISCUSSION

In this multitracer PET study, the *IDH1* mutation is associated with lower glioma uptake of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ and [^{18}F]DPA-714 both *in vitro* and *in vivo*. In addition, our multivariate analysis highlights the advantages of using multiparametric PET since the combination of static (TBR $_{\text{max}}$ of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$)

and dynamic data (slopes of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ and [^{18}F]DPA-714) for these two radiotracers provides good diagnostic performance for discriminating this mutation. In contrast, no significant differences were observed between IDH1+ and IDH1- tumors for [^{18}F]FDG or the three amino acid tracers in both static or dynamic acquisitions.

Our study used an animal model based on human derived HGG cell lines. Even though the IDH1 mutation is predominantly observed in glioma patients with low-grade tumors, one of the advantages of using a high-grade tumor model in preclinical studies is that the rapid growth of these types of tumors makes it far easier to detect any potential differences in PET radiotracer uptake. Several experimental studies have endeavored to develop candidate radiotracers for noninvasive PET imaging of the IDH1 mutation but most of these have yielded inconclusive results due to instability of the radiotracer in blood, lack of radiotracer selectivity or because experiments were not performed under representative physiologic conditions (Chitneni, Yan, et al. 2018; Chitneni, Reitman, et al. 2018; Koyasu et al. 2019). Our current study is original since it uses a combination of six different PET radiotracers to investigate specific pathophysiological pathways of glioma development that may be impacted by the IDH1 mutation.

The most significant radiotracer examined in the present study is [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$, which yielded both static and dynamic datasets. This radiotracer investigates angiogenesis by binding to the $\alpha_v\beta_3$ integrin in glioma cells but also in neovascular endothelial cells (Oxboel et al. 2014). We postulate that the lower uptake of this radiotracer in static images and the drastic decrease in the slope of the dynamic data for IDH1+ tumors are predominantly due to lower glioma cell $\alpha_v\beta_3$ integrin expression rather than a decrease of integrin expression in neovascular endothelial cells. Indeed, our previous study which characterized the IDH1 mutation by *in vivo* multiparametric MRI (unpublished manuscript, A Clément *et al.*), observed a higher vascular density in IDH1+ gliomas suggesting that the tumor vascular network is more functional and similar to the vasculature of healthy tissue. The fact that we observed significantly lower uptake both *in vitro* and *in vivo* in our current study reinforces our premise that [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ is a PET radiotracer that identifies less aggressive IDH1+ tumors, and that the radiotracer is not being trapped by these tumors, which explains the significant difference in decrease of the dynamic slopes curves.

The second radiotracer of interest from our current study is [^{18}F]DPA-714, which targets TSPO receptors, expressed during neuroinflammation. A lower uptake of this radiotracer was observed in IDH1+ tumors both *in vitro* and *in vivo*, although this association did not reach statistical significance in the static *in vivo* study. Similarly to [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$, the [^{18}F]DPA-714 radiotracer also exhibited a more pronouncing decrease slope curve in IDH1+ tumors, also suggesting the absence of uptake of this tracer in tumors expressing the IDH1 mutation. These lower tracer uptake values are consistent with the reduced level of neuroinflammation and by extension the decreased aggressiveness of the IDH+ tumors, which is in complete accordance with reports in the literature (Vlodavsky and Soustiel 2007; Unterrainer et al. 2019). In our recent study exploring multiparametric MRI, we also reported a spectroscopic profile of lower aggressiveness in IDH+ tumors, which further confirms results obtained in the current study (unpublished manuscript, A Clément *et al.*).

Results obtained in the multivariate analysis are very promising since the combination of the TBR $_{\text{max}}$, slope of [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ and slope of [^{18}F]DPA-714 radiotracers provide high predictive performance values to discriminate between the two tumor types. These two radiotracers were also independent predictors as demonstrated by their association in the multivariate analysis and the DICE coefficients. These two radiotracers have also been shown not to cross an intact blood-brain barrier which is not a limitation *per se* since the blood brain barrier is disrupted in the vast majority of HGGs. Moreover, this multivariate analysis underlines the fact that using multiparametric PET, i.e. combining static and dynamic data, is very helpful to extract a maximum of information from PET imaging (Ginet et al. 2020).

Our results obtained with the recommended PET amino-acid radiotracers ([^{18}F]FDopa, [^{18}F]FET and [^{11}C]MET) were somewhat disappointing, since the presence of the IDH mutation in our model did not reveal any significant differences *in vitro* or *in vivo* with static or dynamic PET data, despite promising clinical data with these three radiotracers (Verger, Metellus, et al. 2017; Ginet et al. 2020). Our results with [^{18}F]FDG PET are somewhat less surprising, and consistent with reports in the literature, since this radiotracer does not allow to differentiate tumor tissue from healthy brain cortex because of its physiologic uptake in healthy brain tissue, which limits the potential usefulness of this radiotracer in neuro-oncology (Albert et al. 2016).

There are some inherent limitations to our current study. Even though our immunohistochemistry results confirmed the PET results for GLUT-1 and LAT-1 with no difference in expression observed in our two types of tumors, we failed to observe any significant differences in $\alpha_v\beta_3$ integrin and TSPO receptor expression levels. The most plausible explanation for this observation relates to the low number of immunohistochemistry analyses performed. Furthermore, the highly competitive binding of RGDyK to the $\alpha_v\beta_5$ integrin (Kapp et al. 2017), and to TSPO on activated microglia/macrophages (GAMs) (Winkeler et al. 2012), was not specifically investigated in our current

study, and may partially explain our negative immunohistochemistry results. In any case, the dual validation obtained from our *in vitro* and *in vivo* studies strengthens our results and further preclinical studies with *ex vivo* histo-radiography analyses are required to better define the specific regions of radiotracer uptake. Our current study is also limited by the fact that not all rats were able to be PET imaged for all six radiotracers because we were sometimes unable to obtain all radiotracers in time for the experiment. In addition, although the volumes of IDH1+ tumors were statistically similar to IDH1- tumors, tumor growth was variable between the groups and radiotracer acquisitions. The concordance of *in vitro* and *in vivo* results nevertheless suggests that the contribution of any such potentially confounding effects is limited.

In conclusion, this study supports the very promising predictive value of the combination of [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714 PET to characterize the IDH1 mutation in glioma using a multitracers PET imaging approach. These findings are of interest to further clinical translational studies evaluating this PET imaging procedure.

REFERENCES

1. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffietti R, Kim MM, la Fougère C, Pope W, Law I, Arbizu J, et al. (2016). Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro-Oncol.* 18(9):1199–1208. doi:10.1093/neuonc/now058.
2. Belloli S, Brioschi A, Politi LS, Ronchetti F, Calderoni S, Raccagni I, Pagani A, Monterisi C, Zenga F, Zara G, et al. (2013). Characterization of biological features of a rat F98 GBM model: a PET-MRI study with [¹⁸F]FAZA and [¹⁸F]FDG. *Nucl Med Biol.* 40(6):831–840. doi:10.1016/j.nucmedbio.2013.05.004.
3. Bralten LBC, Kloosterhof NK, Balvers R, Sacchetti A, Lapre L, Lamfers M, Leenstra S, de Jonge H, Kros JM, Jansen EEW, et al. (2011). IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Ann Neurol.* 69(3):455–463. doi:10.1002/ana.22390.
4. Chaumeil MM, Larson PEZ, Yoshihara HAI, Danforth OM, Vigneron DB, Nelson SJ, Pieper RO, Phillips JJ, Ronen SM (2013). Non-invasive in vivo assessment of IDH1 mutational status in glioma. *Nat Commun.* 4:2429. doi:10.1038/ncomms3429.
5. Chen W (2007). Clinical applications of PET in brain tumors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 48(9):1468–1481. doi:10.2967/jnumed.106.037689.
6. Chitneni SK, Reitman ZJ, Spicehandler R, Gooden DM, Yan H, Zalutsky MR (2018). Synthesis and evaluation of radiolabeled AGI-5198 analogues as candidate radiotracers for imaging mutant IDH1 expression in tumors. *Bioorg Med Chem Lett.* 28(4):694–699. doi:10.1016/j.bmcl.2018.01.015.
7. Chitneni SK, Yan H, Zalutsky MR (2018). Synthesis and Evaluation of a 18F-Labeled Triazinediamine Analogue for Imaging Mutant IDH1 Expression in Gliomas by PET. *ACS Med Chem Lett.* 9(7):606–611. doi:10.1021/acsmchemlett.7b00478.
8. Emir UE, Larkin SJ, de Pennington N, Voets N, Plaha P, Stacey R, Al-Qahtani K, Mccullagh J, Schofield CJ, Clare S, et al. (2016). Noninvasive Quantification of 2-Hydroxyglutarate in Human Gliomas with IDH1 and IDH2 Mutations. *Cancer Res.* 76(1):43–49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0934.
9. Frosina G (2016). Non-routine Tracers for PET Imaging of High-grade Glioma. *Anticancer Res.* 36(7):3253–3260.
10. Ginet M, Zaragori T, Marie P-Y, Roch V, Gauchotte G, Rech F, Blonski M, Lamiral Z, Taillandier L, Imbert L, et al. (2020). Integration of dynamic parameters in the analysis of 18F-FDopa PET imaging improves the prediction of molecular features of gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 47(6):1381–1390. doi:10.1007/s00259-019-04509-y.

11. Isal S, Pierson J, Imbert L, Clement A, Collet C, Pinel S, Veran N, Reinhard A, Poussier S, Gauchotte G, et al. (2018). PET imaging of 68Ga-NODAGA-RGD, as compared with 18F-fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. *EJNMMI Res.* 8(1):51. doi:10.1186/s13550-018-0405-5.
12. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, Reuning U, Notni J, Wester H-J, Mas-Moruno C, et al. (2017). A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci Rep.* 7(1):39805. doi:10.1038/srep39805.
13. Koyasu S, Shimizu Y, Morinibu A, Saga T, Nakamoto Y, Togashi K, Harada H (2019). Increased 14C-acetate accumulation in IDH-mutated human glioblastoma: implications for detecting IDH-mutated glioblastoma with 11C-acetate PET imaging. *J Neurooncol.* 145(3):441–447. doi:10.1007/s11060-019-03322-9.
14. Kuhnast B, Damont A, Hinnen F, Catarina T, Demphel S, Le Helleix S, Coulon C, Goutal S, Gervais P, Dollé F (2012). [18F]DPA-714, [18F]PBR111 and [18F]FEDAA1106-selective radioligands for imaging TSPO 18 kDa with PET: automated radiosynthesis on a TRACERLab FX-FN synthesizer and quality controls. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 70(3):489–497. doi:10.1016/j.apradiso.2011.10.015.
15. Law I, Albert NL, Arbizu J, Boellaard R, Drzezga A, Galldiks N, la Fougère C, Langen K-J, Lopci E, Lowe V, et al. (2019). Joint EANM/EANO/RANO practice guidelines/SNMMI procedure standards for imaging of gliomas using PET with radiolabelled amino acids and [18F]FDG: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 46(3):540–557. doi:10.1007/s00259-018-4207-9.
16. Lazovic J, Soto H, Piccioni D, Lo Ru JR, Li S, Mirsadraei L, Yong W, Prins R, Liao LM, Ellingson BM, et al. (2012). Detection of 2-hydroxyglutaric acid in vivo by proton magnetic resonance spectroscopy in U87 glioma cells overexpressing isocitrate dehydrogenase-1 mutation. *Neuro-Oncol.* 14(12):1465–1472. doi:10.1093/neuonc/nos258.
17. Li D, Zhao X, Zhang L, Li F, Ji N, Gao Z, Wang J, Kang P, Liu Z, Shi J, et al. (2014). (68)Ga-PRGD2 PET/CT in the evaluation of Glioma: a prospective study. *Mol Pharm.* 11(11):3923–3929. doi:10.1021/mp5003224.
18. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl).* 131(6):803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
19. Lu HT, Xing W, Zhang YW, Qin HP, Wu RH, Ding JL (2019). [The value of DCE-MRI in predicting IDH gene mutation of high-grade gliomas]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 99(39):3105–3109. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.39.013.
20. Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, Helén P, Sallinen P, Harjuntausta T, Helin H, Alho H (1995). Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res.* 55(12):2691–2695.
21. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Sato N, Takeuchi Y, Kyotani K, Mukasa A, Mizukawa K, Sakata J, et al. (2016). Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. *Neuro-Oncol.* 18(11):1559–1568. doi:10.1093/neuonc/now090.
22. Otabashi M, Vergote T, Desfours C (2017). High yield 18F-FET production on AllinOne (Trasis) at commercial scale. *J Nucl Med.* 58(supplement 1):879–879.
23. Oxboel J, Brandt-Larsen M, Schjoeth-Eskesen C, Myschetzky R, El-Ali HH, Madsen J, Kjaer A (2014). Comparison of two new angiogenesis PET tracers 68Ga-NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and (64)Cu-NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl Med Biol.* 41(3):259–267. doi:10.1016/j.nucmedbio.2013.12.003.

24. Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, Nagarajan R, Yen KE, Bittinger MA, Salamon N, Chou AP, Yong WH, Soto H, et al. (2012). Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol.* 107(1):197–205. doi:10.1007/s11060-011-0737-8.
25. Roncaroli F, Su Z, Herholz K, Gerhard A, Turkheimer FE (2016). TSPO expression in brain tumours: is TSPO a target for brain tumour imaging? *Clin Transl Imaging.* 4:145–156. doi:10.1007/s40336-016-0168-9.
26. Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, Thon N, Goetz C, Kretzschmar HA, Tonn J-C, et al. (2008). Expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol Zurich Switz.* 18(3):378–386. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00137.x.
27. Shi J, Sun B, Shi W, Zuo H, Cui D, Ni L, Chen J (2015). Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 36(2):655–662. doi:10.1007/s13277-014-2644-z.
28. Shi J, Zhao Y, Yuan Y, Wang C, Xie Z, Gao X, Xiao L, Ye J (2016). [The expression of IDH1 (R132H) is positively correlated with cell proliferation and angiogenesis in glioma samples]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol.* 32(3):360–363.
29. SongTao Q, Lei Y, Si G, YanQing D, HuiXia H, XueLin Z, LanXiao W, Fei Y (2012). IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci.* 103(2):269–273. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02134.x.
30. Tang D, Li J, Nickels ML, Huang G, Cohen AS, Manning HC (2019). Preclinical Evaluation of a Novel TSPO PET Ligand 2-(7-Butyl-2-(4-(2-[18F]Fluoroethoxy)phenyl)-5-Methylpyrazolo[1,5-a]Pyrimidin-3-yl)-N,N-Diethylacetamide (18F-VUIIS1018A) to Image Glioma. *Mol Imaging Biol.* 21(1):113–121. doi:10.1007/s11307-018-1198-7.
31. Tiwari V, Mashimo T, An Z, Vemireddy V, Piccirillo S, Askari P, Hulsey KM, Zhang S, de Graaf RA, Patel TR, et al. (2020) Jan 30. In vivo MRS measurement of 2-hydroxyglutarate in patient-derived IDH-mutant xenograft mouse models versus glioma patients. *Magn Reson Med.* doi:10.1002/mrm.28183.
32. Tran AN, Lai A, Li S, Pope WB, Teixeira S, Harris RJ, Woodworth DC, Nghiemphu PL, Cloughesy TF, Ellingson BM (2014). Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro-Oncol.* 16(3):414–420. doi:10.1093/neuonc/not198.
33. Unterrainer M, Fleischmann DF, Diekmann C, Vomacka L, Lindner S, Vettermann F, Brendel M, Wenter V, Ertl-Wagner B, Herms J, et al. (2019). Comparison of 18F-GE-180 and dynamic 18F-FET PET in high grade glioma: a double-tracer pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 46(3):580–590. doi:10.1007/s00259-018-4166-1.
34. Verger A, Metellus Ph, Sala Q, Colin C, Bialecki E, Taieb D, Chinot O, Figarella-Branger D, Guedj E (2017). IDH mutation is paradoxically associated with higher 18F-FDOPA PET uptake in diffuse grade II and grade III gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 44(8):1306–1311. doi:10.1007/s00259-017-3668-6.
35. Verger A, Taieb D, Guedj E (2017). Is the information provided by amino acid PET radiopharmaceuticals clinically equivalent in gliomas? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 44(8):1408–1410. doi:10.1007/s00259-017-3710-8.
36. Vergote T, Otabashi M, Desfours C (2017). A single-use cassette for the automated high-output production of 11C-Methionine. *J Nucl Med.* 58(supplement 1):880–880.

37. Verhoeven J, Bolcaen J, De Meulenaere V, Kersemans K, Descamps B, Donche S, Van den Broecke C, Boterberg T, Kalala J-P, Deblaere K, et al (2019). Technical feasibility of [^{18}F]FET and [^{18}F]FAZA PET guided radiotherapy in a F98 glioblastoma rat model. *Radiat Oncol Lond Engl*. 14(1):89. doi:10.1186/s13014-019-1290-4.
38. Vlodavsky E, Soustiel JF (2007). Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. *J Neurooncol*. 81(1):1–7. doi:10.1007/s11060-006-9199-9.
39. Watabe T, Ikeda H, Nagamori S et al. (2017) ^{18}F -FBPA as a tumor-specific probe of L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a comparison study with ^{18}F -FDG and ^{11}C -Methionine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 44(2):321–331. doi:10.1007/s00259-016-3487-1.
40. Winkeler A, Boisgard R, Awde AR, et al. (2012) The translocator protein ligand [^{18}F]DPA-714 images glioma and activated microglia in vivo. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 39(5):811–823. doi:10.1007/s00259-011-2041-4.

FIGURES

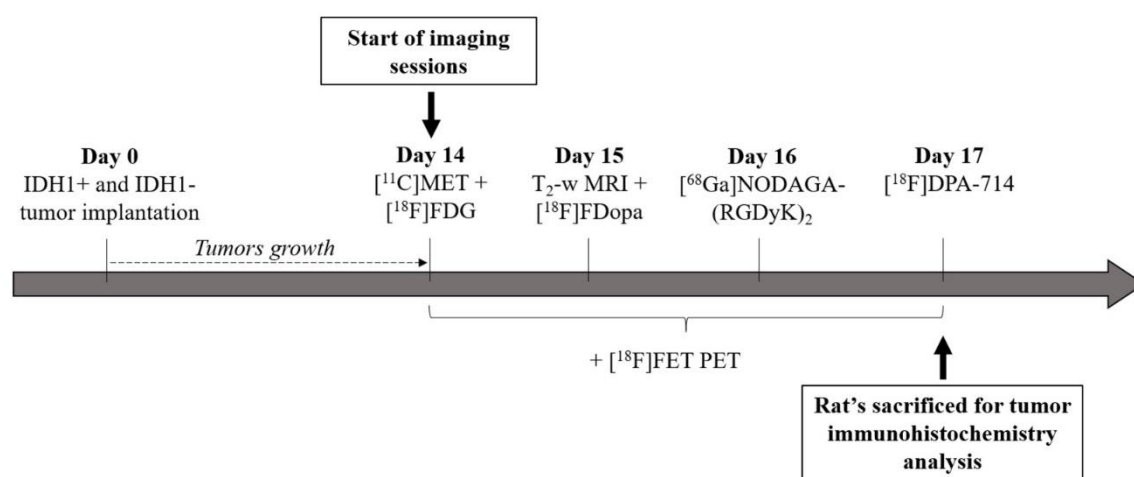


Fig. 1 Flowchart of experimental design. Rats were orthotopically implanted with U87 human derived HGG IDH1+ or IDH1- cell lines. After tumor outgrowth, imaging sessions were each performed over consecutive 4 day periods. The order in which radiotracers were imaged was predicated by their availability and was as follows: [^{11}C]MET and [^{18}F]FDG PET on the 14th day post tumor cell graft (p-g) with a minimum delay of 5 hours between the two radiotracer acquisitions, MRI and [^{18}F]FDopa on the 15th day p-g, [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ on the 16th day p-g and [^{18}F]DPA-714 on the 17th day p-g. [^{18}F]FET PET was performed between the 14th and 17th day p-g. Rats were subsequently sacrificed for tumor immunohistochemistry analyses.

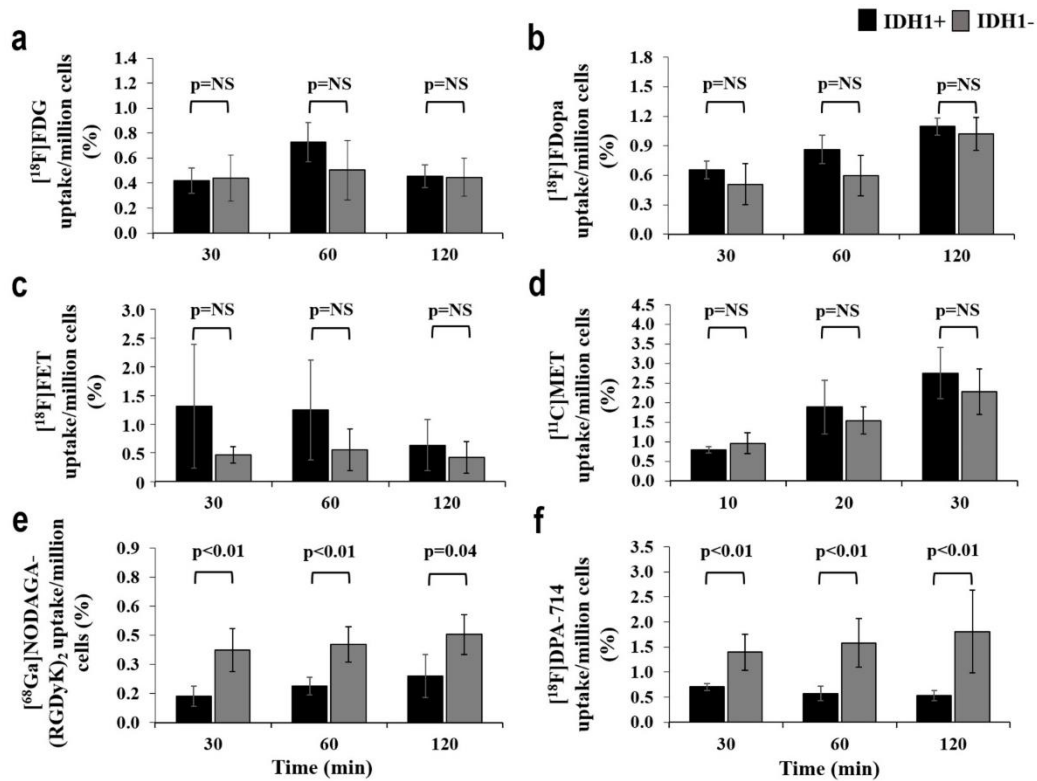


Fig. 2 Histograms of in vitro multitracer analyses for [^{18}F]FDG (left upper panel), [^{18}F]FDopa (right upper panel), [^{18}F]FET (left middle panel), [^{11}C]MET (right middle panel), [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$ (left lower panel) and [^{18}F]DPA-714 (right lower panel) uptake in U87 human derived HGG IDH1+ and IDH1- cell lines at times 30, 60, and 120 min after incubation with all tracers except for [^{11}C]MET (10, 20 and 30 min after incubation) (N=6 measures for each tracers at all times). Radiotracer uptake was expressed as percent uptake per million tumor cells. Mann Whitney tests with p<0.05 significance.

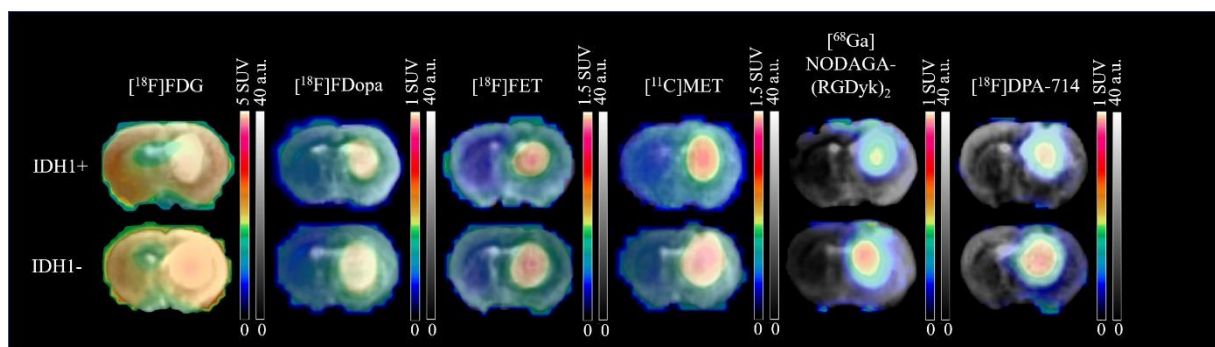


Fig. 3 Representative axial images of static PET imaging merged with T $_2$ -w MRI for IDH1+ and IDH1- tumors with [^{18}F]FDG, [^{18}F]FDopa, [^{18}F]FET, [^{11}C]MET, [^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK) $_2$, and [^{18}F]DPA-714. MRI is expressed as signal intensity and PET on an SUV scale.

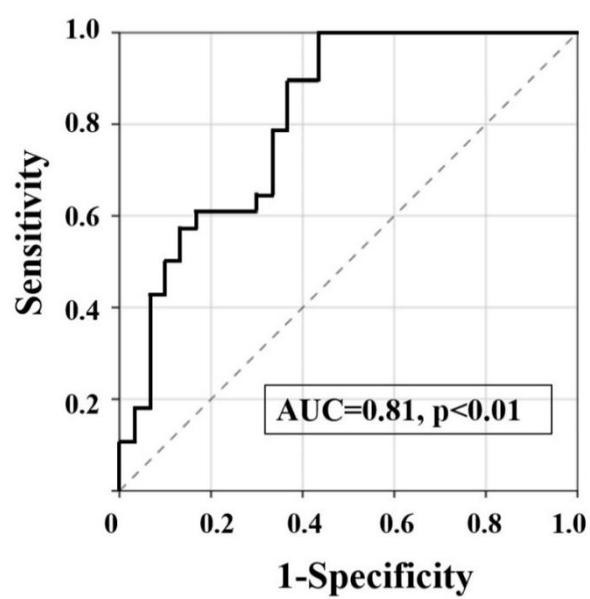


Fig. 4 Receiver operating characteristic (ROC) curve for the combination of TBR_{max} and slope of $[^{68}Ga]NODAGA-(RGDyK)_2$ as well as slope of $[^{18}F]DPA-714$ for distinguishing IDH1+ and IDH1- tumors. Significant ROC curve is represented in bold.

TABLE

Table 1 Results of univariate analyses for MRI and PET data. The Mann Whitney test was used to compare IDH1+ and IDH1- groups with significant adjusted p values <0.05 shown in bold.

Static acquisitions										Dynamic acquisitions				
Radio-tracers	IDH status	Effective	TBR _{mean}	p	TBR _{max}	p	MTV (mm ³)	p	Effective	TTP (min)	p	Slope (SUV/h)	p	
¹⁸ F FDG	IDH1+	N=4	1.56 [1.46; 1.83]	0.65	1.37 [1.30; 1.54]	0.54	221.43 [176.60; 268.82]	1.00	-	-	-	-	-	
	IDH1-	N=7	1.69 [1.61; 1.73]		1.43 [1.40; 1.48]		230.66 [174.15; 273.25]		-	-		-	-	
¹⁸ F FDopa	IDH1+	N=13	2.86 [2.41; 3.26]	0.26	2.51 [2.07; 3.26]	0.26	29.00 [7.32; 210.70]	0.90	N=8	18.00 [17.00; 20.00]	0.49	-0.22 [-0.32; -0.17]	0.49	
	IDH1-	N=13	2.57 [2.51; 2.93]		2.21 [2.11; 2.62]		72.00 [23.30; 202.00]		N=6	13.00 [8.00; 18.00]		-0.31 [-0.38; -0.29]		
¹⁸ F FET	IDH1+	N=8	2.74 [2.59; 2.94]	0.73	2.31 [2.24; 2.81]	0.96	63.15 [38.22; 64.27]	0.88	N=8	105.00 [60.00; 126.00]	0.49	-0.07 [-0.18; 0.09]	0.40	
	IDH1-	N=9	2.70 [2.63; 2.96]		2.39 [2.21; 2.48]		53.70 [28.40; 66.80]		N=9	98.00 [45.00; 126.00]		0.02 [0.06; 0.29]		
¹¹ C MET	IDH1+	N=10	3.45 [3.12; 3.72]	0.69	4.22 [3.78; 4.63]	0.73	144.96 [19.37; 212.77]	0.60	N=5	-	-	-	-	
	IDH1-	N=7	3.24 [3.17; 3.28]		3.97 [3.61; 4.43]		135.06 [95.28; 242.30]		N=2	-		-		
⁶⁸ Ga (RGDyK) ₂	IDH1+	N=11	6.35 [6.05; 6.61]	0.04	7.19 [6.49; 8.00]	0.01	79.60 [60.00; 131.53]	0.07	N=11	6.06 [5.00; 11.00]	0.31	-0.13 [-0.17; -0.11]	0.04	
	IDH1-	N=15	7.46 [6.59; 7.94]		9.79 [8.34; 11.40]		147.89 [109.53; 201.75]		N=15	12.00 [7.00; 24.00]		0.02 [-0.02; 0.07]		
DPA-714	IDH1+	N=7	4.48 [4.43; 4.67]	0.26	3.99 [3.29; 4.67]	0.07	48.50 [31.32; 56.60]	0.05	N=7	10.00 [7.00; 40.00]	0.23	-0.18 [-0.22; -0.16]	0.04	
	IDH1-	N=8	4.86 [4.66; 5.16]		3.52 [4.72; 6.72]		76.80 [68.60; 113.20]		N=8	56.00 [35.00; 126.00]		0.23 [0.07; 0.29]		

SUPPLEMENTARY MATERIAL

PET and MRI parameters

From these previous VOIs, the maximum and mean Standardized Uptake Values were determined (SUV_{max} and SUV_{mean} , respectively). A partial volume effect correction (PVC) was applied to tumor SUV_{max} and SUV_{mean} values using the maximum and mean recovery coefficients (RCs) corresponding to the tumor volume, respectively. For each radiotracer, RCs were computed from phantom experiments using spherical inserts (volume range: [0.031 mL; 0.25 mL]) and a sphere-to-background contrast. After PVC, tumor-to-normal-brain (TBR) ratios were computed as SUV_{mean} or SUV_{max} of the tumor uptake divided by the SUV_{mean} of the normal brain (TBR_{mean} and TBR_{max}). VOIs previously defined on static images, were superimposed on dynamic images. For dynamic analyses, time-activity curves, representing the evolution of the SUV_{peak} of tumor as a function of time, were generated. The SUV_{peak} was used as described in the literature [1] but adapted to animal models with a VOI tumor of 5 mm³. Two dynamic parameters were determined from fitted curves: the time-to-peak (TTP), corresponding to the delay between the onset of the dynamic acquisition (time of tracer injection) and the time-point of the maximal uptake value, and the slope, calculated with a linear regression applied at different times as a function of each radiotracer to determine the maximal observed slope (i.e., [2400-s; 3600-s] for amino-acid radiotracers, [1800-s; 3000-s] for [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂ and [¹⁸F]DPA-714).

Additionally, the Dice Similarity Coefficient (DSC) [2] was further calculated at the individual rat level, to measure the index of similarity between different metabolic volumes obtained with different PET tracers.

For MRI, a volume of interest (VOI) was manually delineated on the T₂-w images of each rat brain to determine the tumor volume.

Immunohistochemistry data analysis

All sections were reviewed by 2 observers (C.P. and A.C.) on an Olympus BX 51 microscope and quantitative analysis was performed with the Image J image-processing software (Version 1.48). GLUT-1 hotspots and αvβ3 vascular sections were counted from one field using a light microscope at 40x magnification. A staining score was applied to TSPO and CD-98 with intensity values 0 : no staining, 1 : light, 2 : moderate or strong < 50% of cells, 3 : strong > 50 % of cells.

Statistical analyses

In vitro variables which were expressed as means and standard deviations. As the number of *in vivo* animals examined was not sufficient to assume a normal distribution, continuous variables were expressed as medians and interquartile ranges. PET and MRI parameters were compared using Mann Whitney or Kruskal Wallis tests with adjusted p values (Benjamini Hochberg correction) to reduce the false discovery rate. The chi-² test was used to compare *ex vivo* immunohistochemistry scores.

For the multivariate analysis, a missing value imputation procedure was carried out using the missForest algorithm [3]. All variables of the univariate analysis were considered in the multivariate logistic regression model to predict the IDH1 mutation. The final model performances obtained from this multivariate analysis were then assessed with a receiving-operator curve (ROC) analysis.

1. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA (2009) From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med 50 Suppl 1:122S–50S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.057307>
2. Zijdenbos AP, Dawant BM, Margolin RA, Palmer AC (1994) Morphometric analysis of white matter lesions in MR images: method and validation. IEEE Trans Med Imaging 13:716–724. <https://doi.org/10.1109/42.363096>
3. Stekhoven DJ, Bühlmann P (2012) MissForest--non-parametric missing value imputation for mixed-type data. Bioinforma Oxf Engl 28:112–118. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597>

SUPPLEMENTARY FILE

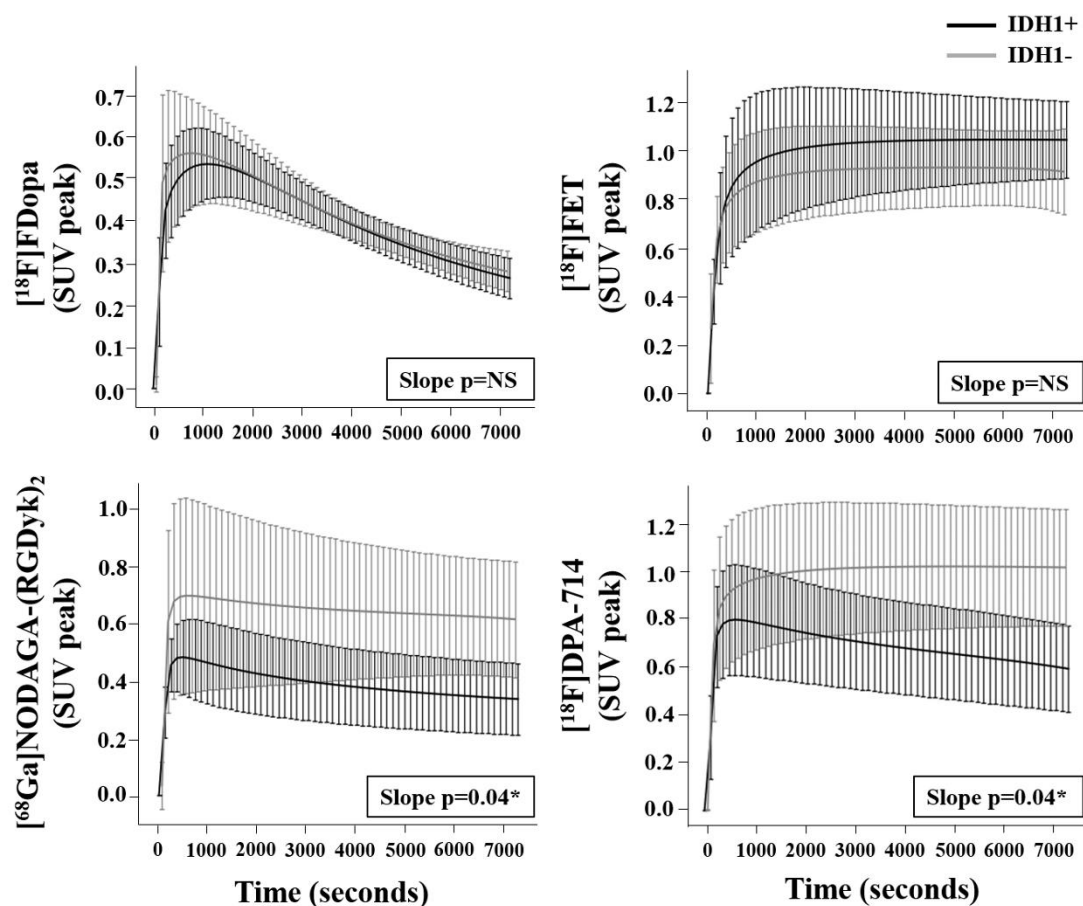


Fig. S1 Time-activity curves representing the evolution of the SUV_{peak} of IDH1+ and IDH1- tumors as a function of time for (a) $[^{18}F]FDopa$ (b) $[^{18}F]FET$, (c) $[^{68}Ga]NODAGA-(RGDyk)_2$ and (d) $[^{18}F]DPA-714$. Mann Whitney test with $p < 0.05$ significance to compare IDH1+ and IDH1- tumors. No dynamic analyses are presented for $[^{18}F]FDG$ PET (not performed) and $[^{11}C]MET$ PET (only N=5 IDH1+ and N=2 IDH1-).

Table S1 Two-way table of available imaging session samples for each radiotracer with both static and list-mode acquisitions.

Static																			
Radiotracers	Radiotracers	["F]FDG		["F]FDOPA		["F]FET		["C]-MET		["Ga]NODAGA-(RGDyK) ₂		["F]DPA-714							
		IDH1+	IDH1-	IDH1+	IDH1-	IDH1+	IDH1-	IDH1+	IDH1-	IDH1+	IDH1-	IDH1+	IDH1-						
["F]FDG	IDH1+	4	-	4	-	0	-	4	-	3	-	0	-						
	IDH1-	-	7	-	7	-	0	-	5	-	7	-	0						
["F]FDOPA	IDH1+	4	-	13	-	0	-	9	-	6	-	5	-						
	IDH1-	-	7	-	13	-	0	-	7	-	9	-	5						
["F]FET	IDH1+	0	-	0	-	8	-	0	-	6	-	0	-						
	IDH1-	-	0	-	0	-	9	-	0	-	0	-	0						
["C]-MET	IDH1+	4	-	9	-	0	-	10	-	5	-	1	-						
	IDH1-	-	5	-	7	-	0	-	7	-	4	-	1						
["Ga]NODAGA-(RGDyK) ₂	IDH1+	3	-	6	-	6	-	5	-	11	-	0	-						
	IDH1-	-	7	-	9	-	0	-	4	-	15	-	5						
["F]DPA-714	IDH1+	0	-	5	-	0	-	1	-	0	-	7	-						
	IDH1-	-	0	-	5	-	0	-	1	-	5	-	8						
List-mode																			
["F]FDOPA	IDH1+	0	-	8	-	0	-	5	-	1	-	5	-						
	IDH1-	-	0	-	6	-	0	-	2	-	4	-	5						
["F]FET	IDH1+	0	-	0	-	8	-	0	-	6	-	0	-						
	IDH1-	-	0	-	0	-	9	-	0	-	0	-	0						
["C]-MET	IDH1+	0	-	5	-	0	-	5	-	0	-	1	-						
	IDH1-	-	0	-	2	-	0	-	2	-	1	-	1						
["Ga]NODAGA-(RGDyK) ₂	IDH1+	0	-	1	-	6	-	0	-	11	-	5	-						
	IDH1-	-	0	-	4	-	0	-	1	-	15	-	0						
["F]DPA-714	IDH1+	0	-	5	-	0	-	1	-	5	-	7	-						
	IDH1-	-	0	-	5	-	0	-	1	-	0	-	8						

Table S2 Results of the multivariate analysis for MRI and data PET for predicting the IDH mutation. P values in bold are parameters that remained significant after the multivariate logistic regression analysis.

Parameters	Radiotracers	Coefficient	p
MRI volume	-	-	0.97
TBR_{mean}	[¹⁸ F]FDG	-	0.86
	[¹⁸ F]FDopa	-	0.86
	[¹⁸ F]FET	-	0.46
	[¹¹ C]MET	-	0.49
	[⁶⁸ Ga]-NODAGA-(RGDyk) ₂	-	0.99
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0.71
TBR_{max}	[¹⁸ F]FDG	-	0.77
	[¹⁸ F]FDopa	-	0.62
	[¹⁸ F]FET	-	0.13
	[¹¹ C]MET	-	0.32
	[⁶⁸ Ga]-NODAGA-(RGDyk) ₂	-0.41	0.01
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0.48
MTV	[¹⁸ F]FDG	-	0.19
	[¹⁸ F]FDopa	-	0.65
	[¹⁸ F]FET	-	0.65
	[¹¹ C]MET	-	0.80
	[⁶⁸ Ga]-NODAGA-(RGDyk) ₂	-	0.78
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0.98
TTP	[¹⁸ F]FDopa	-	0.83
	[¹⁸ F]FET	-	0.98
	[⁶⁸ Ga]-NODAGA-(RGDyk) ₂	-	0.74
	[¹⁸ F]DPA-714	-	0.99
Slope	[¹⁸ F]FDopa	-	0.44
	[¹⁸ F]FET	-	0.47
	[⁶⁸ Ga]-NODAGA-(RGDyk) ₂	-8.54	0.02
	[¹⁸ F]DPA-714	-8.70	<0.01

Table S3 Results of the Dice Similarity Coefficient (DSC) between different metabolic volumes of different PET tracers. Only groups of N>5 for a direct comparison between two radiotracers are shown.

Radiotracers comparison	Effective	DICE mediane [Q1 ; Q3]
[⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyk)₂ ; [¹⁸F]FDopa	N= 13	0.71 [0.39 ; 0.76]
[⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyk)₂ ; [¹¹C]MET	N= 8	0.76 [0.72 ; 0.80]
[⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyk)₂ ; [¹⁸F]DPA-714	N= 6	0.73 [0.73 ; 0.76]
[⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyk)₂ ; [¹⁸F]FET	N= 5	0.69 [0.69 ; 0.70]
[⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyk)₂ ; [¹⁸F]FDG	N= 10	0.73 [0.68 ; 0.81]
[¹⁸F]FDopa ; [¹¹C]MET	N=16	0.74 [0.65 ; 0.80]
[¹⁸F]FDopa ; [¹⁸F]DPA-714	N=9	0.38 [0.26 ; 0.55]
[¹⁸F]FDopa ; [¹⁸F]FDG	N= 9	0.73 [0.63 ; 0.80]
[¹¹C]MET ; [¹⁸F]FDG	N=7	0.70 [0.69 ; 0.79]

RESUME

L'intégration des paramètres moléculaires dans la classification des gliomes par l'OMS en 2016, particulièrement la mutation IDH1^{R132H}, a un réel impact diagnostique. Cette mutation est associée à un meilleur pronostic mais les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à son expression sont encore mal connus. Ce travail propose une approche par imagerie multimodale intégrant de l'IRM multiparamétrique et de la TEP multitraceurs multiparamétrique pour la caractérisation non invasive de cette mutation dans les gliomes. Des cellules de gliome de haut grade humain (U87-MG) exprimant ou non la mutation IDH1^{R132H} (IDH1+ ; IDH1-) par la méthode CRISP/Cas9 ont été étudiées en culture cellulaire (*in vitro*), dans un modèle préclinique de rat après une greffe orthotopique (*in vivo*) et après dissection (*ex vivo*). *In vitro*, les tumeurs IDH1+ ont montré de faibles niveaux d'expression des intégrines $\alpha\beta3$ et des récepteurs TSPO considérés comme des marqueurs biologiques d'agressivité dans les voies de l'angiogenèse et de l'inflammation tumorale. *In vivo*, ces tumeurs IDH1+ présentaient une néo-vascularisation plus dense mais davantage fonctionnelle, similaire à un réseau vasculaire cérébral sain en IRM (4.7T). Les variations des spectres par résonance magnétique corroboraient ces résultats faisant état d'un profil en métabolites moins agressif pour ces tumeurs exprimant la mutation IDH1^{R132H}. La combinaison des paramètres statiques et dynamiques en TEP avec une diminution de la fixation et une pente plus prononcée en TEP au [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂, ainsi qu'une diminution de la fixation en TEP à la [¹⁸F]DPA-714 dans les tumeurs IDH+, ciblant respectivement les intégrines $\alpha\beta3$ et les récepteurs TSPO permettait d'obtenir de bonnes performances diagnostiques dans la discrimination de la mutation IDH1^{R132H}. *Ex vivo*, l'analyse spectroscopique retrouvait un profil de métabolites moins agressif. Cette étude translationnelle, démontrant l'intérêt de l'imagerie multimodale et multiparamétrique, associe l'expression de la mutation IDH1^{R132H} à un profil tumoral de moindre agressivité dans des cellules de gliome de haut grade humain. Cette étude pilote, après validation sur des cultures de cellules primaires humaines, pourrait conduire à une étude clinique d'imagerie multimodale pour la caractérisation non invasive de la mutation IDH1^{R132H}.

MOTS CLES : gliomes, TEP multitraceurs, IRM multiparamétriques, préclinique, étude translationnelle.

ABSTRACT

The integration of molecular parameters in the classification of gliomas by the WHO in 2016, particularly IDH1^{R132H} mutational status, has significant diagnostic impact. This mutation is associated with a better prognosis but the physiopathological mechanisms underlying its expression remain poorly understood. Our work evaluates a multimodal imaging approach integrating multiparametric MRI and multiparametric multitracer PET to non-invasively characterize this mutation in gliomas. High grade human glioma cells (U87-MG) expressing or not the IDH1^{R132H} mutation (IDH1+ ; IDH1-), constructed using CRISP/Cas9 were studied in cell culture (*in vitro*), in a preclinical rat model after stereotactic grafting (*in vivo*) and after autopsy (*ex vivo*). *In vitro*, IDH1+ tumors expressed low levels of integrins $\alpha\beta3$ and TSPO receptors which are considered to be biological markers of aggressiveness involving angiogenesis and tumor inflammation pathways. *In vivo*, MRIs (4.7T) of these IDH1+ tumors showed areas of high vascular densities which were characterized by functional neo-vascularizations, comparable to healthy cerebral vascular networks. Magnetic resonance spectra variations confirmed these results and revealed a less aggressive metabolite profile for these IDH1+ tumors. The combination of static and dynamic PET parameters with decreased uptake and a pronounced decrease in the PET slope of [⁶⁸Ga]NODAGA-(RGDyK)₂, as well as decreased PET uptake of [¹⁸F]DPA-714 in IDH1+ tumors, targeting $\alpha\beta3$ integrins and TSPO receptors, yielded good diagnostic performances to discriminate the IDH1^{R132H} mutation. *Ex vivo*, spectroscopic analyses indicated less aggressive metabolic profile. This translational study demonstrates the benefits of multimodal and multiparametric imaging, and associates expression of the IDH1^{R132H} mutation, in high-grade human glioma cells with a less aggressive tumor profile. Validation of results from this pilot study in human primary cell cultures, may lead to a clinical multimodal imaging study to non-invasively characterize the IDH1^{R132H} mutation.

KEYWORDS: glioma, multitracer PET, multiparametric MRI, preclinical, translational study.
