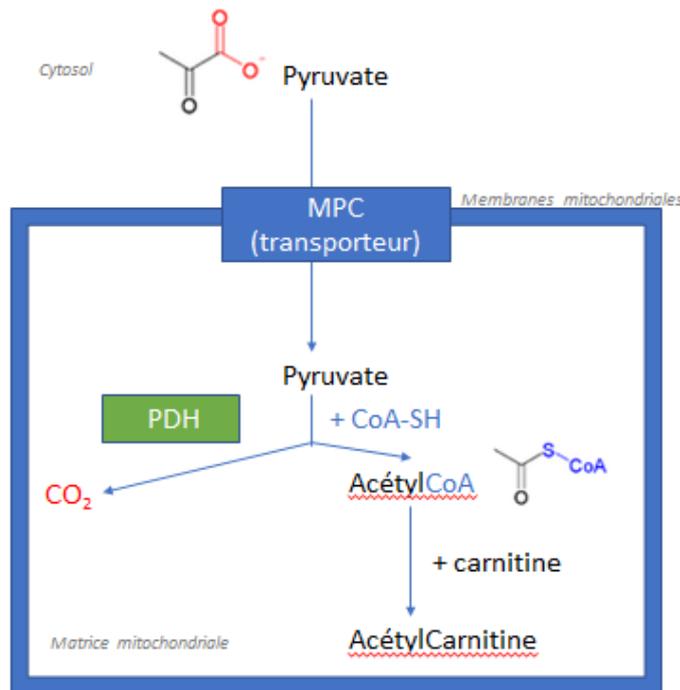
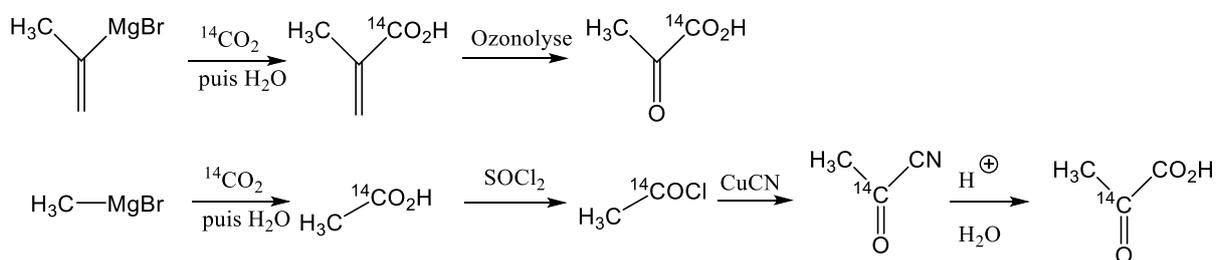


Exercice 1

Les défauts de transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC) ou d'activité de l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) sont des pathologies rares entraînant des troubles neurologiques importants. Le diagnostic peut se faire en recherchant des mutations pathogènes dans les gènes codant pour le transporteur ou la PDH. Parfois, il est retrouvé des variants de signification inconnue (VUS) dans ces gènes, il est alors demandé au laboratoire de biologie médicale spécialisée de réaliser des tests d'activité sur les fibroblastes des patients pour déterminer si ces VUS entraînent ou non un déficit.



Le laboratoire utilise deux types de pyruvate marqué au C_{14} notés **A*** et **B***, un marqué sur le carbone de la fonction acide carboxylique et un marqué sur le carbone adjacent à la fonction acide carboxylique. Les synthèses de ces deux types de pyruvates marqués sont présentées dans le schéma suivant :



1. Pour la seconde synthèse, rappelez le mécanisme de réaction du magnésien ainsi que le mécanisme de la réaction entre le chlorure d'acyle et le cyanure de cuivre.

Les mesures de transport ou d'activité ont les principes suivants, elles durent chacune 24H :

(1) Fibroblastes (patient ou témoin) + 1 mL de mélange pyruvate non radiomarké + pyruvate **A*** → mesure finale du CO_2^* capté sur du papier filtre imprégné de KOH puis mis dans une fiole avec du liquide de scintillation. La réaction est réalisée en présence de triton, qui perméabilise les membranes mitochondriales

(2) Fibroblastes (patient ou témoin) + 1 mL de pyruvate non radiomarqué + pyruvate **B*** + carnitine → mesure finale d'acétylcarnitine* après élution dans une colonne échangeuse d'ion (volume d'élution 1 mL) puis 0.25 mL d'éluant est mis dans une fiole avec du liquide de scintillation. La réaction 2 réalisée en l'absence de triton

2. *Quelle réaction sert à évaluer le transport mitochondrial du pyruvate et quelle réaction sert à mesurer l'activité de la PDH ? Quel position de marquage va-t-on choisir pour réaliser l'expérience 1 ? Pour l'expérience 2 ?*
3. *Le carbone¹⁴ est-il un radioélément adapté pour l'expérience envisagée ? Peut-il être remplacé par du carbone¹¹ ?*
4. *Quel compteur à scintillation sera utilisé ?*

Pour la mesure du transporteur mitochondrial du pyruvate, le % de pyruvate ayant pénétré dans la mitochondrie est noté %entrée et est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ entrée} = \frac{\text{RA totale mesurée dans les fibroblastes du témoin ou du patient}}{\text{RA totale du mélange initial}}$$

Le % entrée normal pour une personne saine est d'environ 50%. Chaque mesure est réalisée en duplicate.

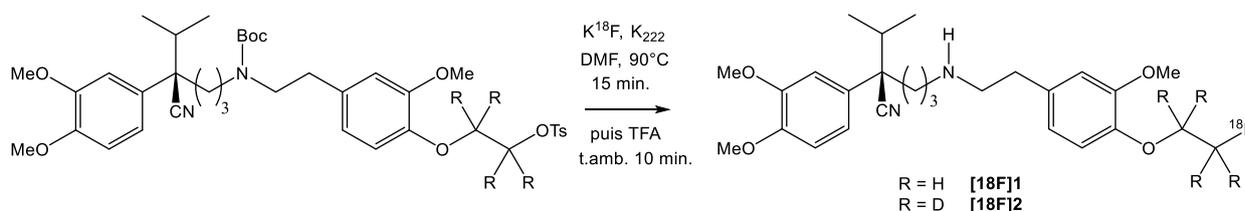
5. *Complétez le tableau. D'après les résultats, que concluez-vous sur l'effet délétère des variants de signification inconnu 1 à 5 ?*

VUS	Cpm du mélange initial de pyruvate * (1 mL)	Cpm de l'éluat (témoin) (250 µL)	Cpm de l'éluat (patient porteur du VUS) (250 µL)	« % entrée » témoin	« % entrée » patient	Conclusion
1	799.2-800.8	100.1-99.9	99.8-100.2			
2	799.3-800.7	99.8-100.2	24.9-25.1			
3	799.2-800.8	24.9-25.1	24.8-25.2			
4	159.5-160.5	19.9-20.1	19.8-20.2			
5	38.0-42.0	0.0-4.0	1.0-9.0			

6. *Pour le cas 4, quelle raison a pu amener le laboratoire à utiliser seulement un mélange initial contenant moins de pyruvate radiomarqué ? Cela a-t-il un impact sur le résultat ?*
7. *Pour le cas 5, comment expliquer la variabilité entre les duplicates ? Comment y remédier ?*

Exercice 2

La P-glycoprotéine est une protéine d'efflux présente dans la barrière hématoencéphalique, sa fonction est d'excréter les xénobiotiques du cerveau vers le sang. Le Vérapamil est une molécule connue pour être excrétée *via* cette protéine. Différentes familles d'analogues marqués au ^{18}F du Vérapamil ont ainsi été développées pour permettre l'étude *in-vivo* de la P-glycoprotéine (extrait de *Nuclear Medicine and Biology* **2018**, 64-65, 47-56). La synthèse de deux de ces molécules est résumée dans le schéma suivant.



1. Par quel même mécanisme procède la 1^{ère} étape de synthèse de ces molécules ? A quoi sert le K_{222} lors de cette étape ?
2. Pourrait-on avoir ces mêmes molécules **1** et **2** marquées cette fois-ci au ^{11}C ? Proposez un lieu de marquage au ^{11}C et la réaction pour y parvenir.
3. En vous basant sur les données de synthèse indiquées dans le schéma, calculer le pourcentage d'activité spécifique restant à la fin de la synthèse de la molécule **[^{18}F]1**.
4. Quels sont les éléments structuraux des analogues du vérapamil utilisés dans cette étude qui permettent de prévoir un bon passage dans le cerveau ? Pourquoi ?
5. Afin d'évaluer l'effet du substituant R sur la stabilité métabolique, des études de métabolisation dans du plasma ont été effectuées et donnent les fractions des molécules parents et de leurs métabolites en fonction du temps passé dans le plasma.

Molécule dosée	Temps (min.)	[^{18}F]1	[^{18}F]2
Molécule parent	5	20 ± 3 %	36 ± 6 %
	15	8 ± 3 %	15 ± 2 %
Métabolites non polaires	5	5 ± 3 %	5 ± 6 %
	15	5 ± 1 %	4 ± 1 %
Métabolites polaires	5	75 ± 3 %	59 ± 4 %
	15	87 ± 1 %	81 ± 2 %

En comparant les deux composés, peut-on dire s'il y a un effet du substituant R sur la stabilité métabolique ? Justifiez. Quelle molécule vous semble la plus stable métaboliquement ?

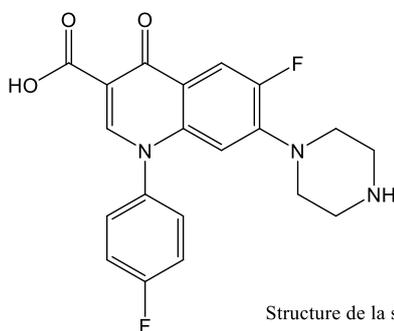
6. Des études sur l'excrétion de ces composés hors du cerveau ont été effectuées et donnent les fractions des molécules parents présentes dans le cerveau en fonction du temps.

Temps (min.)	[¹⁸ F]1	[¹⁸ F]2
5	26 ± 6 %	46 ± 4 %
15	17 ± 7 %	34 ± 4 %
60	6 ± 1 %	11 ± 2 %

En comparant les deux composés, peut-on dire s'il y a un effet du substituant R sur l'excrétion des molécules hors du cerveau? Justifiez. Quelle molécule vous semble la moins excrétée ?

Exercice 3

Un complexe ^{99m}Tc-sarafloxacin a été développé pour le suivi en imagerie des infections bactériennes et inflammations chez l'Homme (extrait de *Journal of Radioanalysis and Nuclear Chemistry* **2016**, 307, 699-705).



1. La structure exacte du complexe ^{99m}Tc-sarafloxacin n'est pas connue à ce jour. Néanmoins, au vu de la structure de la sarafloxacin, quelles fonctions sont susceptibles d'être impliquées dans la complexation au ^{99m}Tc ?
2. La complexation entre le ^{99m}Tc et la sarafloxacin se fait de manière directe par réaction entre la sarafloxacin (entre 1,3 et 6,4 nmol) et Na^{99m}TcO₄ (0,02 nmol) en présence de SnCl₂.H₂O (entre 110 et 880 nmol). Différentes conditions sont étudiées (quantité de SnCl₂, de sarafloxacin, durée de réaction, pH du milieu) pour optimiser les conditions.

2a. Quel est le rôle de SnCl₂ lors de cette complexation ?

2b. Comparer les quantités de SnCl₂ et de sarafloxacin utilisées par rapport à la quantité de Na^{99m}TcO₄. Justifier ce choix.

2c. Au vu des figures suivantes présentant les proportions de complexe (^{99m}Tc-sarafloxacin complex), de pertechnate libre (Free ^{99m}TcO₄⁻) et de forme réduite du pertechnate (RH-^{99m}Tc) dans les différents essais en fonction des variables étudiées (quantité de substrat, de SnCl₂, pH du milieu, durée de réaction), indiquer en justifiant les conditions optimales pour la réaction.

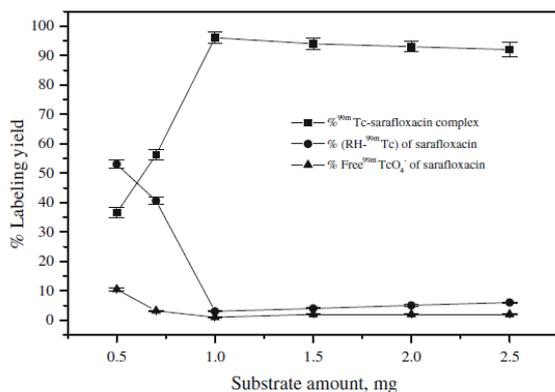


Fig. 3 Effect of substrate amount on the labeling yield of ^{99m}Tc-sarafloxacin complex

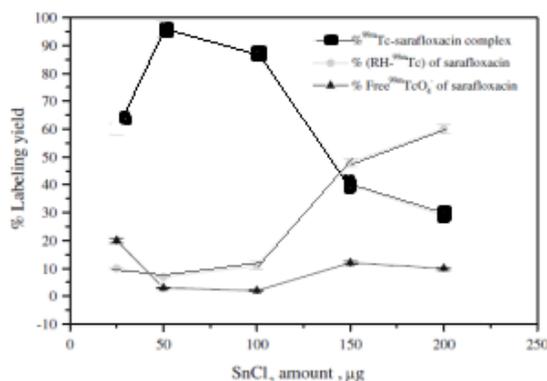


Fig. 4 Effect of SnCl₂·2H₂O amount on the labeling yield of ^{99m}Tc-sarafloxacin complex

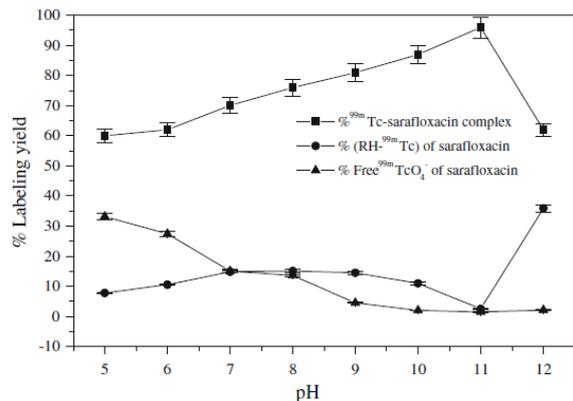


Fig. 5 Effect of pH of the reaction on the labeling yield of ^{99m}Tc-sarafloxacin complex

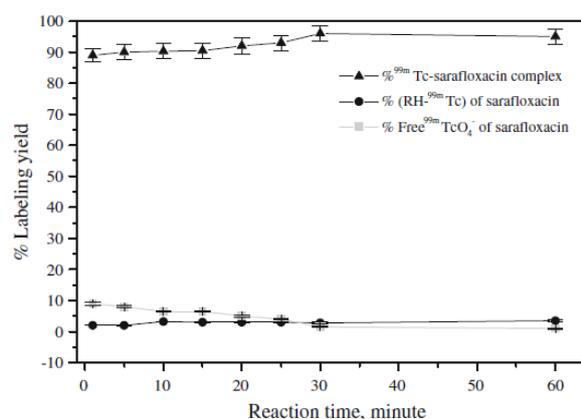


Fig. 6 Effect of reaction time on ^{99m}Tc-sarafloxacin complex

3. La biodistribution du complexe est présentée dans le tableau suivant le type d'inflammation provoquée (par *S Aureus* forme active ou inactivée, par l'essence de térébenthine). Le complexe est administré par voie intraveineuse dans la queue des souris (n=5).

Table 1 Biodistribution of ^{99m}Tc-sarafloxacin in *S. aureus*, heat killed *S. aureus* and turpentine oil inflamed mice at different time periods

Organs and body fluids	Percent Injected dose/organs at different time periods (h)								
	<i>S. aureus</i>			Heat killed <i>S. aureus</i>			Turpentine oil		
	2	4	24	2	4	24	2	4	24
Inflamed muscle	1.10 ± 0.1	0.75 ± 0.2	0.30 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.71 ± 0.1	0.28 ± 0.1	0.90 ± 0.0	0.69 ± 0.1	0.21 ± 0.2
Control muscle	0.28 ± 0.0	0.22 ± 0.1	0.16 ± 0.1	0.30 ± 0.0	0.22 ± 0.1	0.17 ± 0.0	0.29 ± 0.1	0.23 ± 0.1	0.14 ± 0.0
Liver	19.1 ± 2.1	15.1 ± 1.0	7.3 ± 0.2	20.6 ± 2.7	15.2 ± 3.2	7.9 ± 0.3	19.5 ± 2.0	15.2 ± 2.3	8.1 ± 0.5
Urine	20.5 ± 2.8	26.8 ± 3.2	31.9 ± 4.1	19.1 ± 1.5	27.3 ± 2.1	33.4 ± 3.4	19.0 ± 0.8	27.4 ± 2.0	31.8 ± 3.2
Kidneys	12.4 ± 1.4	17.9 ± 1.6	8.7 ± 0.6	13.7 ± 2.1	20.2 ± 2.3	8.3 ± 0.7	13.6 ± 1.8	18.6 ± 1.3	7.8 ± 0.2
Blood	6.9 ± 0.2	4.5 ± 0.3	1.0 ± 0.2	5.9 ± 0.5	4.8 ± 1.2	1.3 ± 0.4	6.0 ± 0.1	4.5 ± 0.3	1.0 ± 0.1
Heart	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Lung	1.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Intestine and stomach	21.9 ± 3.1	5.9 ± 0.4	4.10 ± 0.6	22.1 ± 2.9	4.6 ± 1.3	4.6 ± 0.9	19.9 ± 2.1	6.7 ± 1.1	4.4 ± 1.4
Spleen	2.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.4 ± 0.0	2.5 ± 0.2	1.6 ± 0.4	0.7 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Bone	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.0

Inflamed muscle: muscle enflammé – Control muscle: muscle sain - Liver: foie – Kidney: rein – Blood: sang – Heart: cœur – Lung: poumon – Intestine and stomach: intestin et estomac – Spleen: rate – Bone: os

3a. Au vu des résultats présentés, y-a-t-il une sélectivité pour le muscle enflammé vis-à-vis du muscle sain ? Justifier.

3b. Au vu des résultats présentés, quel est le temps optimal pour évaluer l'inflammation ? Justifier.

3c. Au vu des résultats présentés, y-a-t-il une distinction faite entre une infection et une inflammation stérile ? Justifier.

3d. Au vu des résultats présentés, y-a-t-il métabolisation de ce complexe ? Par quelle(s) voie(s) ? Justifier.