



HAL
open science

**MEDECINE NUCLEAIRE ET MALADIE
CORONARIENNE : EVALUATION DE TRACEURS
DE LA PERFUSION MYOCARDIQUE ET DE LA
PLAQUE D'ATHEROME VULNERABLE**

Alexis Broisat

► **To cite this version:**

Alexis Broisat. MEDECINE NUCLEAIRE ET MALADIE CORONARIENNE : EVALUATION DE TRACEURS DE LA PERFUSION MYOCARDIQUE ET DE LA PLAQUE D'ATHEROME VULNERABLE. Médicaments. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00009143

HAL Id: tel-00009143

<https://theses.hal.science/tel-00009143>

Submitted on 29 Apr 2005

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

U.F.R de Médecine

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Ecole Doctorale : Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Discipline : Génie Biologique et Médical

ALEXIS BROISAT

le 12 Avril 2005

Médecine nucléaire et maladie coronarienne :

Evaluation de traceurs de la perfusion myocardique et de la
plaque d'athérome vulnérable.

Directeur de thèse : Pr. Daniel FAGRET

Co-Directrice de thèse : Dr. Catherine GHEZZI

Composition du jury :

Mr le Professeur André Syrota : Président

Mr le Professeur Philippe Franken : Rapporteur

Mr le Professeur Jacques Bonnet : Rapporteur

Mr le Professeur Daniel Fagret

Mr le Docteur Laurent Riou

Mr le Professeur Gerald Vanzetto

Mr le Professeur Pascal Dumy

**Thèse préparée au sein de l'équipe INSERM 0340 – Radiopharmaceutiques Biocliniques
– Faculté de médecine de Grenoble – Université Joseph Fourier – Grenoble I.**

Etude in vivo de la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Introduction générale..... 15

Revue bibliographique

I. Intérêt clinique..... 17

II. Principe..... 19

III. Les principaux traceurs 20

 A. Les traceurs utilisables en imagerie SPECT 20

 1. Le thallium 201 20

 1.1 Caractéristiques physiques 20

 1.2 Mécanismes de captation cellulaire du thallium 201 21

 a. Localisation intracellulaire 22

 b. Inhibition métabolique - hypoxie 22

 1.3 Captation myocardique du thallium 201 23

 a. Cinétique de fixation et fraction d'extraction 23

 b. Débit de perfusion myocardique régional et captation du ^{201}Tl 24

 1.4 Elimination myocardique du thallium 201 25

 a. Lavage global 26

 b. Lavage intrinsèque 28

 1.5 Redistribution du thallium 201 29

 a. Modèles d'ischémie-reperfusion 29

 b. Modèles d'ischémie permanente 30

 1.6 Conclusion 32

 2. Les traceurs technétiés 32

 2.1 Caractéristiques physiques du technétium-99m 32

 2.2 Tc-Mibi 33

 a. Mécanismes de captation cellulaire du Tc-Mibi 33

 (a) Localisation intracellulaire 34

 (b) Inhibitions métaboliques - hypoxie 35

 b. Captation myocardique du Tc-Mibi 36

(a) Cinétique de captation et fraction d'extraction	36
(b) Débit de perfusion myocardique régional et captation de Tc-Mibi	36
c. Elimination myocardique du Tc-Mibi.....	38
d. Redistribution du Tc-Mibi.....	38
e. Conclusion.....	39
2.3 Teboroxime	40
a. Mécanismes de captation cellulaire de la teboroxime.....	40
b. Captation myocardique de la teboroxime.....	41
(a) Cinétique de captation et fraction d'extraction	41
(b) Débit de perfusion myocardique régional et fixation de la teboroxime.....	42
c. Elimination myocardique de la teboroxime	43
d. Redistribution de la teboroxime	43
e. Conclusion.....	45
2.4 Tetrafosmine	45
a. Mécanismes de captation cellulaire de la tetrafosmine.....	45
b. Captation myocardique de la tetrafosmine.....	46
(a) Cinétique de fixation et fraction d'extraction	46
(b) Débit de perfusion myocardique régional et captation de la tetrafosmine...	46
c. Elimination myocardique de la tetrafosmine	47
d. Redistribution de la tetrafosmine	47
e. Conclusion.....	48
2.5 ^{99m} TcN-NOET	48
a. Localisation cellulaire de ^{99m} TcN-NOET.....	48
b. Captation myocardique de ^{99m} TcN-NOET.....	50
(a) Extraction myocardique de ^{99m} TcN-NOET.....	50
(b) Débit de perfusion myocardique régional et fixation de ^{99m} TcN-NOET	51
c. Elimination myocardique de ^{99m} TcN-NOET	53
d. Redistribution de ^{99m} TcN-NOET	54
(a) Modèles d'ischémie-reperfusion.....	54
(b) Modèles d'ischémie permanente.....	55
e. Conclusion.....	56
3. Conclusion	57
B. Les traceurs utilisables en imagerie TEP	59
1. Intérêt.....	59

2. Principe	59
3. Les traceurs	60
4. ⁸² Rb	60
5. ¹³ N-Ammoniac	62
6. ¹⁵ O-Eau	64
IV. Conclusion.....	65

Travail expérimental

I. Etude de l'effet du vérapamil sur la fixation myocardique de ^{99m}TcN-NOET <i>in vivo</i> sur un modèle expérimental d'ischémie myocardique chez le chien.	67
A. Introduction.....	67
B. Matériel et méthode	69
1. Préparation des radiotraceurs	69
1.1 ^{99m} TcN-NOET	69
1.2 ²⁰¹ Tl	70
2. Animaux utilisés	70
3. Anesthésie	70
4. Chirurgie	71
5. Protocoles expérimentaux.....	71
5.1 Principe de la mesure des débits par la technique des microsphères radioactives	71
5.2 Groupe 1 : étude de la fixation de ^{99m} TcN-NOET dans le myocarde sain	72
5.3 Groupe 2 : étude de la fixation de ^{99m} TcN-NOET dans le myocarde ischémique	73
5.4 Cinétique sanguine	74
6. Analyses post-mortem	74
6.1 Détermination des débits sanguins myocardiques régionaux par la méthode des microsphères radioactives	74
6.2 Quantification de la captation myocardique de ^{99m} TcN-NOET et du ²⁰¹ Tl	76
6.3 Détermination de la concentration plasmatique en vérapamil	76
7. Analyses statistiques	77
C. Résultats.....	78

1. Résultats du groupe Groupe 1	78
1.1 Paramètres hémodynamiques	78
1.2 Comportement de ^{99m} TcN-NOET	79
a. Cinétique sanguine de ^{99m} TcN-NOET	79
b. Débits sanguins myocardiques et captation de ^{99m} TcN-NOET	79
2. Résultats du groupe Groupe 2	80
2.1 Paramètres hémodynamiques	80
2.2 Comportement de ^{99m} TcN-NOET	81
a. Cinétique sanguine de ^{99m} TcN-NOET	81
b. Débits sanguins myocardiques et captation de ^{99m} TcN-NOET	82
(a) Région saine	82
(b) Région ischémique	83
c. Captations myocardiques de ^{99m} TcN-NOET et du ²⁰¹ Tl et débits myocardiques	84
D. Discussion	86
1. Dosage du verapamil	86
2. Choix du traitement pour le groupe contrôle	86
3. Groupe 1 : étude de la fixation de ^{99m} TcN-NOET dans le myocarde sain	87
3.1 Paramètres hémodynamiques	87
3.2 Comportement de ^{99m} TcN-NOET	87
4. Groupe 2 : étude de la fixation de ^{99m} TcN-NOET dans le myocarde ischémique ...	87
4.1 Paramètres hémodynamiques	87
4.2 Comportement de ^{99m} TcN-NOET	88
5. La fixation myocardique de ^{99m} TcN-NOET	89
5.1 Résultats des études antérieures	89
5.2 Résultats de l'étude	90
6. Limitations	90
E. Conclusion et implication clinique	91
 II. Evaluation des captations myocardiques de ^{99m}TcN-NOET et du Thallium-201 <i>in vivo</i> sur des modèles expérimentaux chroniques d'ischémie reperfusée ou non-reperfusée chez le rat.....	92
A. Introduction	92

B.	Matériel et méthodes.....	94
1.	Préparation des radiotraceurs.....	94
1.1	$^{99m}\text{TcN-NOET}$:	94
1.2	$^{125}\text{I-SAB}$:	94
1.3	$^{99m}\text{Tc-DTPA}$ et ^{201}Tl :	94
2.	Etudes <i>in vitro</i>	95
3.	Etudes <i>in vivo</i>	96
3.1	Chirurgie	96
a.	Préparation de la chirurgie	96
b.	Protocole chirurgical	96
3.2	Protocoles expérimentaux	98
a.	$^{99m}\text{TcN-NOET}$ et ^{201}Tl (1).....	98
b.	Débits sanguins myocardiques régionaux (2)	99
c.	$^{125}\text{I-SAB}$ et $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ (3).....	100
3.3	Analyses post-mortem	101
a.	Coloration au TTC	101
b.	Imagerie double isotopes <i>ex vivo</i> et quantification de la surface et de l'amplitude des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl	102
c.	Détermination des débits sanguins myocardiques régionaux	103
d.	Détermination des volumes de distribution fractionnels de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ et $^{125}\text{I-SAB}$	103
e.	Analyses statistiques	104
C.	Résultats.....	105
1.	Expérimentations <i>in vitro</i>	105
2.	Expérimentations <i>in vivo</i>	106
2.1	Surface des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl : comparaison avec la taille de l'infarctus	106
2.2	Amplitude des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl : comparaison avec les débits sanguins myocardiques régionaux	108
2.3	Volumes de distribution fractionnels de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ et $^{125}\text{I-SAB}$ dans le myocarde sain et reperfusé	110
D.	Discussion.....	111
E.	Conclusions et implications cliniques.....	115
III.	Conclusion générale	116

Evaluation de nouveaux radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable

Revue Bibliographique

I.	Introduction	118
II.	Epidémiologie	119
III.	Physiopathologie de la plaque d'athérome.....	120
A.	Rappels sur la structure de l'artère.....	120
1.	L'intima.....	121
2.	La media.....	121
3.	L'adventice	121
B.	Les évènements initiaux au développement de l'athérosclérose	122
1.	La dysfonction endothéliale.....	122
2.	Le rôle des lipoprotéines de basse densité dans l'athérosclérose	123
2.1	Rappel sur les lipoprotéines	124
a.	Rôle des lipoprotéines	124
b.	Métabolisme des lipoprotéines.....	125
2.2	Le transfert des LDL du sang vers la paroi artérielle	128
a.	Mécanismes du transfert.....	128
(a)	Transfert par diffusion.....	128
(b)	Transfert médié par récepteur	128
b.	Transfert des LDL et athérosclérose.....	129
(a)	Modification de la diffusion des LDL et athérosclérose.....	129
(b)	Le rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose	130
2.3	L'origine des LDL oxydées	131
C.	Le recrutement des monocytes.....	133
1.	Les molécules d'adhésion.....	133
1.1	Les sélectines : le « rolling »	133
1.2	Les immunoglobulines et VCAM-1 : adhésion et transmigration	134
a.	Adhésion.....	134
b.	La transmigration endothéliale.....	137
2.	Les cytokines	138

D.	La formation des cellules spumeuses.....	139
E.	La progression de l'athérosclérose.....	140
F.	Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérome.....	142
1.	Apoptose et athérosclérose	142
2.	Les métalloprotéinases.....	143
3.	La néoangiogénèse.....	144
4.	Rupture et formation du thrombus.....	144
IV.	Classification des plaques d'athérome	145
V.	La plaque d'athérome vulnérable.....	148
VI.	Les facteurs de risque qui vulnérabilisent la plaque	149
A.	L'hypercholestérolémie	150
B.	Le diabète.....	151
C.	Le tabac.....	152
VII.	Stabiliser la plaque d'athérome vulnérable	153
A.	Mesures hygiéno-diététiques	153
B.	Les pharmaceutiques.....	154
1.	Traitements actuels	154
1.1	Les Statines	154
1.2	Les hypotenseurs	158
1.3	Les anti-thrombotiques	159
2.	Les nouvelles cibles	159
2.1	Les PPARs	159
2.2	Les récepteurs nucléaires X	162
VIII.	Diagnostiquer la plaque d'athérome vulnérable.....	162
A.	Evaluation du risque biologique	162
B.	L'imagerie de la plaque d'athérome	163
1.	L'imagerie invasive	164
1.1	Les techniques non spectroscopiques	164

a.	L'angiographie	164
(a)	Principe.....	164
(b)	Intérêt	164
(c)	Limitations	165
b.	L'angioscopie.....	165
(a)	Principe.....	165
(b)	Intérêt	166
(c)	Limitations	166
c.	L'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS).....	166
(a)	Principe.....	166
(b)	Intérêt	167
(c)	Limitations	167
(d)	Perspectives.....	167
d.	La tomographie par cohérence optique (OCT)	169
(a)	Principe.....	169
(b)	Intérêt	169
(c)	Limitations	170
e.	La thermographie	170
(a)	Principe.....	170
(b)	Intérêt	170
(c)	Limitations	170
f.	Les sondes fluorescentes activables	171
(a)	Principe.....	171
(b)	Intérêt	171
(c)	Limitations	172
g.	L'IRM intravasculaire	172
(a)	Principe.....	172
(b)	Intérêt	172
(c)	Limitations	172
h.	La médecine nucléaire.....	173
(a)	Principe.....	173
(b)	Intérêt	173
(c)	Limitations	174
1.2	Les techniques spectroscopiques	175

a.	Spectroscopie Raman	175
(a)	Principe.....	175
(b)	Intérêt	175
(c)	Limitations	175
b.	Spectroscopie proche infrarouge (NIR)	175
(a)	Principe.....	175
(b)	Intérêt	176
(c)	Limitations	176
c.	Spectroscopie en fluorescence	177
(a)	Principe.....	177
(b)	Intérêt	177
(c)	Limitations	177
1.3	Conclusion	177
2.	L'imagerie non-invasive	178
2.1	La tomographie par rayons X.....	178
a.	Principe.....	178
b.	Intérêt	178
c.	Limitations	179
2.2	L'IRM.....	179
a.	Principe.....	179
b.	Intérêt	179
c.	Limitations	180
d.	Perspectives.....	180
2.3	La médecine nucléaire.....	181
a.	Les lipides	182
(a)	LDL natives.....	182
(b)	LDL oxydées	182
(c)	Peptides	182
(d)	Anticorps	183
b.	Les cellules musculaires lisses proliférantes.....	184
(a)	Analogues de l'endothéline.....	184
(b)	Anticorps	185
(c)	Analogues de l'adénine	186
c.	Les métalloprotéinases	186

d. Les macrophages	187
(a) Anticorps	188
(b) MCP-1	188
(c) [¹⁸ F]-Fluorodéoxyglucose	189
e. L'apoptose	190
f. Le thrombus.....	191
g. Conclusions	191
3. Conclusion	192
IX. Conclusion générale	193
 Travail expérimental	
I. Introduction	196
A. Choix de la cible	196
B. Choix du ligand.....	197
II. Chimie et radiochimie	198
A. Synthèse des peptides	198
B. Radiomarquage	199
1. Radioiodation.....	199
2. Radiomarquage au Technétium 99m	200
2.1 Tc-B2702.....	200
2.2 Tc-RAFT-B2702.....	200
C. Marquage fluorescent.....	200
D. Stabilité des traceurs	201
III. Affinité des ligands pour VCAM-1.....	201
A. Principe	201
B. Matériel et méthodes.....	202
C. Résultats.....	203
D. Discussion.....	205

IV. Etudes <i>in vivo</i> chez le lapin WHHL	206
A. Matériel et méthodes.....	206
1. Choix du modèle expérimental	206
2. Protocoles.....	207
2.1 Protocole 1 : Evaluation de ¹²⁵ I-B2702(R) et ¹²⁵ I-B2702.....	208
a. Animaux	208
b. Anesthésie	208
c. Cathétérisation.....	208
d. Dosages plasmatiques	209
e. Injection du radiotraceur	209
f. Cinétique sanguine	209
g. Euthanasie	209
h. Analyses post mortem	209
2.2 Protocole 2 : Evaluation de ¹²³ I-B2702, ^{99m} Tc-B2702 et ^{99m} Tc-RAFT-B2702.....	210
a. Animaux	210
b. Anesthésie, cathétérisation et dosages plasmatiques.....	210
c. Imagerie planaire par détection de simple photon	210
d. Injection du radiotraceur	211
e. Cinétique sanguine	211
f. Euthanasie	211
g. Analyses post mortem	211
2.3 Analyses post-mortem.....	212
a. Biodistribution et cinétique sanguine.....	212
b. Autoradiographie.....	212
c. Coloration des aortes au Sudan IV.....	212
d. Quantification des images autoradiographiques	212
(a) Groupe WHHL	213
(b) Groupe Contrôle.....	213
e. Analyses statistiques	213
f. Histologie et Immunohistochimie	213
(a) Histologie	214
(b) Immunohistochimie.....	214

B.	Résultats.....	216
1.	Validation du modèle expérimental.....	216
1.1	Dosages plasmatiques.....	216
1.2	Coloration au Sudan IV.....	216
1.3	Histochimie et immunohistochimie.....	217
a.	Animaux Contrôles.....	218
(a)	Coloration trichrome.....	218
(b)	Immunohistochimie.....	218
b.	Animaux WHHL - régions Sudan IV-négatives.....	219
(a)	Coloration trichrome.....	219
(b)	Immunohistochimie.....	219
c.	Animaux WHHL - régions Sudan IV- positives.....	219
(a)	Coloration trichrome.....	219
(b)	Immunohistochimie.....	219
2.	Evaluation de ^{125}I -B2702(R) et de ^{125}I -B2702.....	220
2.1	Cinétique sanguine.....	220
2.2	Biodistribution.....	221
2.3	Stabilité.....	222
2.4	Autoradiographie.....	222
2.5	Quantification des autoradiographies.....	223
3.	Evaluation de ^{123}I -B2702, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702 et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702.....	225
3.1	Cinétique sanguine.....	225
3.2	Biodistribution.....	227
3.3	Stabilité.....	228
3.4	Imagerie planaire.....	229
3.5	Autoradiographie.....	230
3.6	Quantification.....	231
V.	Discussion.....	233
A.	Choix de la cible.....	233
B.	Choix du ligand.....	233
C.	Etude in vitro de l'interaction cible-ligand.....	234
D.	Choix du modèle pour les études in vivo.....	234

Table des matières

E.	Validation du modèle.....	235
F.	Evaluation de ^{125}I -B2702(R) et ^{125}I -B2702.....	236
G.	Evaluation de ^{123}I -B2702, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702, et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702.....	237
H.	Comparaison avec les autres radiotraceurs proposés.....	239
	1. MCP-1 et Annexin V	240
	2. La place de B2702	240
I.	Conclusions et perspectives	241
	Références bibliographiques.....	242

Introduction Générale

Introduction générale

Les pathologies cardiovasculaires, et plus particulièrement la maladie coronarienne, représentent la première cause de mortalité dans le monde, soit 1/3 des décès. Actuellement, la médecine nucléaire représente la principale modalité d'imagerie pour le diagnostic et la prise en charge de cette pathologie.

La médecine nucléaire est une technique d'imagerie moléculaire dont le principe repose sur l'injection par voie intraveineuse de molécules d'intérêt radiomarquées, ou radiotraceurs, spécifiques d'une cible ou d'un mécanisme biologique d'intérêt. La détection externe des émissions radioactives à l'aide de caméras sensibles aux émissions gamma (Single Photon Emission Tomographie, SPECT) ou aux positons (Tomographie par émission de positons, TEP) permet de réaliser de l'imagerie scintigraphique.

Dans le cadre de la maladie coronarienne, les radiotraceurs utilisés sont des traceurs de la perfusion myocardique. Le traceur de perfusion de référence est le thallium-201. Cependant, le ^{201}Tl présente un certain nombre d'inconvénients (dosimétrie, énergie d'émission et coût), et de nouveaux radiotraceurs ont été développés ou sont en cours de développement. Parmi les nombreux radiotraceurs technétiés qui ont été développés, le $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ présente des caractéristiques d'extraction et de redistribution myocardiques comparables à celle du thallium-201. Les études portant sur la fixation cellulaire de ce traceur indiquent que $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ est un traceur pur du débit sanguin coronaire. Néanmoins, certaines interrogations subsistent concernant son comportement *in vivo*. **La première partie de cette thèse porte sur l'étude de la fixation myocardique *in vivo* de ce radiotraceur, d'une part en présence d'un inhibiteur calcique, et d'autre dans le cadre d'un infarctus chronique du myocarde.**

Il est aujourd'hui admis que la rupture d'une plaque d'athérome vulnérable est l'évènement responsable de la survenue d'accidents coronariens. Ces plaques vulnérables sont invisibles à la coronarographie et, à l'heure actuelle, malgré l'intérêt clinique majeur que représente leur détection, il n'existe aucune technique non invasive utilisable en pratique clinique permettant de les visualiser. **La seconde partie de cette thèse porte sur l'évaluation de nouveaux radiotraceurs potentiels de la plaque d'athérome vulnérable.**

Partie I :

Revue

Bibliographique

**Les traceurs radioactifs du débit
sanguin coronaire.**

I. Intérêt clinique

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), les pathologies cardiovasculaires sont responsables de 16,7 millions de décès par an soit un tiers des décès dans le monde (OMS 2003). L'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux en sont les causes principales. Durant de nombreuses années, les techniques d'investigation clinique avaient pour but de mettre en évidence la présence d'une sténose coronarienne significative induisant une oblitération de la lumière vasculaire supérieure ou égale à 50%. Lorsqu'une telle sténose est détectée, l'attitude thérapeutique consiste à la lever, soit par angioplastie, soit par pontage aorto-coronarien.

Développée dans les années 50, la coronarographie, première technique d'imagerie *in vivo* des artères coronaires est alors devenue la méthode de référence pour le diagnostic des pathologies coronariennes. Cette technique d'imagerie invasive repose sur l'injection d'un produit de contraste iodé, via un cathéter placé dans l'artère à explorer. Ce produit de contraste opaque aux rayons X permet l'obtention d'images radiologiques de la lumière des vaisseaux (luminographie).

Cependant, depuis une quinzaine d'années, de nombreuses études cliniques ont remis en cause cette technique de diagnostic de référence de la maladie coronaire :

1 – Les études réalisées en post-infarctus ont montré que chez deux tiers des patients présentant un infarctus du myocarde, on ne retrouvait pas de sténose coronarienne significative sur l'artère responsable de la pathologie (Ambrose 1988, Little 1988, Nobuyoshi 1991).

2 – Les études portant sur le pronostic de la scintigraphie de perfusion indiquent que lorsque celle-ci est normale, le taux d'évènements coronariens aigus est identique à celui de la population générale (Brown 1991, Machecourt 1994), et ceci quel que soit l'état anatomique du réseau coronaire (Brown 1993).

3 – Le développement de l'échographie endocoronaire a permis de mettre en évidence la présence de plaques d'athérome, voire de sténose significative, alors même que la lumière de la coronaire reste normale à la coronarographie (Glagov 1987, Mintz 1995, Hausmann 1996).

4 – Dans de nombreuses pathologies comme le diabète (Nahser 1995), l'hypertension artérielle (Laine 1998), l'hypertrophie myocardique (Schwartzkopff 1998) ou simplement une

hypercholestérolémie (Reddy 1994, Yokohama 1998), il a été montré une diminution de la réserve coronaire alors que la coronarographie est normale.

Parallèlement à ces études cliniques, des progrès considérables dans la connaissance de l'endothélium vasculaire et de la physiopathologie de l'athérosclérose ont été réalisés et permettent maintenant d'expliquer les résultats cliniques de ces études :

1 – La rupture d'une simple plaque d'athérome vulnérable expliquerait l'angor instable, les infarctus du myocarde et de nombreuses morts subites (Fuster 1994, Fuster 1995, Ross 1999, Glass 2001).

2 – En revanche, l'évolution de la plaque d'athérome vers une plaque fibreuse aboutirait à une oblitération progressive de la lumière vasculaire parallèlement au développement d'une circulation collatérale par angiogénèse (Fuster 1994, Fuster 1995). Ceci expliquerait la perfusion myocardique normale malgré la présence de sténoses anatomiques.

3 – La discordance apparente entre les anatomopathologistes et les cardiologues sur le degré de sténose coronarienne est expliquée par le développement excentrique par remodelage positif de la plaque d'athérome alors même que la lumière vasculaire reste normale (Glagov 1987, Mintz 1995, Hausmann 1996).

4 – La diminution de la réserve coronaire dans certaines pathologies est due à un dysfonctionnement de l'endothélium. Celui-ci induit une contraction des vaisseaux lors d'un stress au lieu d'induire une dilatation, ce qui aboutit à une ischémie myocardique en aval.

L'ensemble de ces résultats explique que l'étude de la perfusion myocardique devienne le pivot central de la gestion de la maladie coronaire.

En pratique clinique quotidienne, la médecine nucléaire est la seule technique utilisée pour diagnostiquer l'ischémie myocardique de manière non invasive. Le principe de cette modalité d'imagerie moléculaire repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarqué, ou radiotraceur, spécifique d'une molécule ou d'un mécanisme biologique d'intérêt. L'imagerie est ensuite réalisée par détection externe de la radioactivité à l'aide d'une caméra sensible aux photons émis lors de la désintégration de l'isotope radioactif. Ainsi, on détecte les photons gamma en imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), ou les photons résultant de l'annihilation de positons en imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons).

II. Principe

Parmi les méthodes utilisées pour mesurer le débit de perfusion myocardique, celles utilisant des molécules extractibles sont basées sur le principe de Sapirstein (1958), selon lequel la captation d'une molécule par un organe **ou** par le corps entier dépend :

- du débit sanguin (DS) irrigant l'organe **ou** du débit cardiaque total,
- de la concentration artérielle de la molécule,
- du rapport d'extraction (RE) de la molécule par l'organe **ou** par le corps entier. Ceci est résumé par les relations 1 et 2 :

$$\text{Captation}_{\text{organe}} = \text{DS}_{\text{organe}} * [\text{traceur}]_{\text{artérielle}} * \text{RE}_{\text{organe}} \text{ (relation 1)}$$

$$\text{Captation}_{\text{corps}} = \text{Débit cardiaque}_{\text{total}} * [\text{traceur}]_{\text{artérielle}} * \text{RE}_{\text{corps}} \text{ (relation 2)}$$

La concentration artérielle en molécule provenant à un organe est identique à celle du corps entier. Si les rapports d'extraction de la molécule par l'organe et par le corps entier sont identiques, la captation de la molécule est alors le reflet de la part du débit cardiaque total allouée à l'irrigation de cet organe (relation 3). La molécule est alors un traceur de débit.

$$\text{Captation}_{\text{organe}}/\text{DS}_{\text{organe}} = \text{Captation}_{\text{corps entier}}/\text{Débit cardiaque}_{\text{total}} \text{ (relation 3)}.$$

Sapirstein a appliqué son principe pour la mesure du débit de perfusion myocardique à l'aide d'une biodistribution du ^{42}K chez le rat.

Pour permettre le diagnostic clinique de l'ischémie myocardique par simple détection externe de la radioactivité, les caractéristiques physiques et biologiques du traceur doivent remplir un cahier des charges :

- La fraction d'extraction myocardique de la molécule au premier passage doit être la plus élevée possible.
- Sa rétention myocardique doit être suffisamment longue pour permettre la réalisation d'images scintigraphiques.
- Son élimination doit être suffisamment rapide pour permettre la réalisation de plusieurs protocoles.

- Une énergie d'émission comprise entre 100 et 200 keV sera optimale pour la détection des rayonnements par les gamma-caméras en SPECT.
- La dosimétrie délivrée au patient doit être la plus faible possible.
- La disponibilité du traceur doit être élevée.
- Enfin, son coût doit être le plus faible possible.

La mise au point d'un traceur radioactif du débit sanguin coronaire utilisable cliniquement a débuté par l'évaluation d'isotopes ou d'analogues radioactifs du potassium. Le thallium 201 a finalement été retenu (Lebowitz 1975) pour ses propriétés physiques et biologiques supérieures à celles du ^{42}K , du ^{43}K , du ^{86}Rb et du ^{81}Rb .

III. Les principaux traceurs

La médecine nucléaire est une technique d'imagerie moléculaire généralement utilisée de manière non invasive. Son principe repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarké, ou radiotraceur, spécifique d'une cible d'intérêt. L'imagerie est ensuite réalisée par détection externe de la radioactivité à l'aide d'une caméra sensible aux photons émis lors de la désintégration de l'isotope radioactif. Ainsi, on détecte les photons gamma en imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), ou les photons résultant de l'annihilation de positons en imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons).

A. Les traceurs utilisables en imagerie SPECT

1. Le thallium 201

1.1 Caractéristiques physiques

Le thallium est un élément métallique du groupe III-A de la classification périodique. Son analogie avec le potassium s'explique par le fait que le rayon ionique hydraté des deux éléments est proche (0,266 nm pour le potassium et 0,280 nm pour le thallium). L'isotope 201 du thallium décroît par capture électronique avec une demi-vie de 73,1 heures. Ceci s'accompagne d'une émission de rayons gamma de 135 et 167 keV, et de rayons X d'énergie

comprise entre 69 et 83 keV. Ces rayons X permettent la réalisation de scintigraphies grâce à l'emploi de collimateurs basse énergie - haute résolution.

1.2 Mécanismes de captation cellulaire du thallium 201

Sur cardiomyocytes de rats nouveau-nés et pour des concentrations traceuses en thallium 201 (10 nM à 5 μ M), le $T_{1/2}$ de la cinétique de fixation du traceur est de $4,95 \pm 0,51$ minutes et le plateau de captation est atteint après 30 minutes (McCall 1985). Le $T_{1/2}$ de lavage est de 6 minutes (Maublant 1988). La ouabaïne (1 mM), inhibiteur de la Na/K ATPase, diminue de 60% la captation du thallium 201 à 2 minutes (Figure 1), et est sans effet sur le lavage de la molécule. Il est donc admis que la captation du thallium 201 a lieu pour 60% environ par la Na/K ATPase (McCall, 1985). Ces résultats sont confirmés par différentes équipes (Rauch 1985, Piwnica-Worms 1992, Arbab 1998). Le rapport des concentrations intra- et extracellulaire de thallium 201 à l'équilibre est de 50:1, et l'affinité du traceur pour la pompe sodique est 260 à 900 fois plus élevée que celle du potassium. Ceci explique que le thallium 201 soit capté par le myocarde même pour de très faibles concentrations circulantes en traceur. Le cotransport Na/K/2Cl est responsable de 25% de la captation du thallium 201 sur cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Arbab 1998). Les participations relatives de la pompe sodique et du cotransport varient fortement selon le type cellulaire (Sessler 1986, Sehweil 1989).

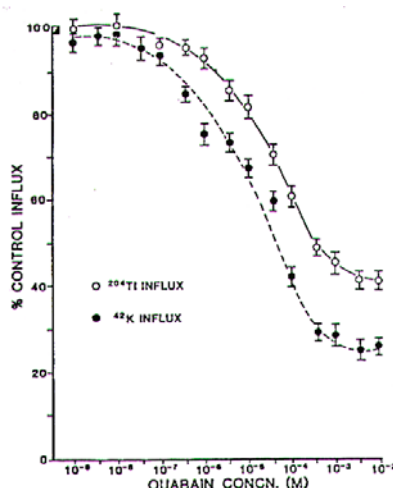


Figure 1. Courbe dose-réponse de l'effet de la ouabaïne (10^{-9} M à 10^{-2} M) sur la captation cellulaire du ^{204}Tl et du ^{42}K (McCall 1985).

Sur un modèle de septum interventriculaire perfusé de lapin, Krivokapitch et Shine (1981) ont étudié l'effet d'un inhibiteur de la Na/K ATPase, l'acétylstrophanthidine (ACS) sur les cinétiques de captation et de lavage du thallium 201. Leurs résultats indiquent que la pompe sodique n'est pas impliquée dans la captation du traceur sur leur modèle.

a. Localisation intracellulaire

Les cinétiques de captation et de lavage du thallium 201 sont de type monoexponentiel, indiquant que le traceur est localisé dans un seul compartiment intracellulaire (McCall 1985). Friedman et al. (1987) ont modélisé les cinétiques de captation et de ressortie du thallium 201 sur des cellules ventriculaires d'embryons de poulets perfusées à débit constant. Leurs données sont également en accord avec une localisation du traceur dans un seul compartiment intracellulaire. Ceci est confirmé par Arbab et al. (1998) dont l'étude indique que le thallium 201 est localisé dans le cytosol. Dans ce contexte, les résultats obtenus sur biopsie de ventricule gauche après injection intraveineuse chez le rat semblent discordants (Llaurado 1979). En effet, ils indiquent l'existence de 2 compartiments intracellulaires pour la localisation du thallium 201, le cytosol et la mitochondrie. La captation mitochondriale du traceur est augmentée à l'exercice. Les différences avec les études précédemment citées sont peut-être dues aux différences dans les modèles utilisés.

Enfin, la captation du thallium 201 sur 3 types cellulaires présents dans le cœur (cellules endothéliales, fibroblastes, cardiomyocytes) indique que la quantité de traceur captée ne varie pas dans de grandes proportions d'un type cellulaire à l'autre (Caldwell, 1992).

b. Inhibition métabolique - hypoxie

Lors d'une inhibition métabolique induite par l'acide iodoacétique 1 mM (IAA) associé à la roténone (10 μ M), la vitesse de captation initiale du thallium 201 diminue parallèlement à la diminution en ATP intracellulaire. Cette diminution représente 50 à 70 % de la valeur contrôle : elle correspond donc à la proportion de thallium 201 transportée par la Na/K ATPase. Pour une déplétion complète en ATP sans relargage de LDH, c'est à dire sans mort cellulaire, la vitesse initiale de captation se stabilise à 30 % de la valeur contrôle (Piwnicka-Worms 1992).

La captation nette du traceur n'est pas affectée par une incubation avec le cyanure seul (Maublant 1988). Ceci confirme que la captation du thallium 201 est en partie dépendante de l'ATP glycolytique, qui est utilisé pour le maintien de l'intégrité membranaire (Opie 1992). Lorsque cette intégrité est perdue, la captation du thallium 201 est diminuée de 90 à 98% (Maublant 1993).

L'hypoxie est sans effet majeur sur les cinétiques d'accumulation et de lavage cellulaires du traceur, indépendamment du débit de perfusion (Friedman 1987). La concentration en oxygène est choisie dans cette étude de manière à inhiber la contraction cellulaire.

1.3 Captation myocardique du thallium 201

La captation myocardique initiale du traceur dépend d'une part de la fraction d'extraction du traceur par le myocarde, et d'autre part du débit de perfusion myocardique.

a. Cinétique de fixation et fraction d'extraction

En conditions normales, la captation myocardique du thallium 201 chez le chien atteint 80% de sa valeur maximale 1 minute après injection intraveineuse ; le pic d'activité myocardique se situe 25 minutes après l'injection. Cette cinétique de captation est ralentie lorsque le débit de perfusion est diminué (Okada 1982, Okada 1982⁽²⁾).

La fraction d'extraction est la proportion de traceur passant du compartiment sanguin au tissu myocardique lors du premier passage de la molécule. La méthode la plus couramment utilisée pour mesurer la fraction d'extraction d'un traceur consiste à coinjecter dans le système artériel la molécule et une substance non-extraite, l'albumine, dans des proportions connues. La collecte d'échantillons de sang veineux en aval de l'organe considéré permet de déterminer le nouveau rapport des concentrations et d'en déduire la fraction extraite de traceur (Weich 1977).

En utilisant cette méthode, la fraction d'extraction myocardique du thallium 201 chez le chien en conditions normales est de 82 à 88% (Weich 1977⁽²⁾, Grunwald 1981, Melin 1986). Cette valeur n'est pas affectée par une variation de la fréquence cardiaque, par l'insuline, par le propranolol, par une augmentation du pH sanguin (Weich 1977), ou par une diminution de la

pression de perfusion coronaire (Grunwald 1981). Elle diminue lorsque le débit sanguin coronaire (DSC) augmente selon la relation :

Fraction d'extraction = $87,04 - 39,10 \log \text{DSC}$ (avec DSC de base = 1).

Sur cœur isolé et à débit constant, l'hypoxie induite par une perfusion avec 95 % d'azote et 5 % de CO₂ est sans effet sur l'extraction myocardique du thallium 201, malgré d'importantes altérations hémodynamiques (Leppo 1986, Leppo 1987, Meerdink 1989). Weich et al. (1977) ont montré une diminution de 12 % de la fraction d'extraction du thallium 201 *in vivo* chez le chien en situation hypoxique. Cependant, le débit sanguin coronaire est augmenté de 70% dans ces conditions, ce qui pourrait en soi expliquer la diminution observée (cf relation ci-dessus).

L'effet de la ouabaïne sur l'extraction instantanée maximale (E_{\max}) et sur la rétention (E_{net}) du thallium 201 est controversée : Meerdink et Leppo (1989) n'ont pas mis en évidence de diminution de l' E_{\max} du thallium 201 sur cœur isolé de lapin en présence de doses thérapeutique (0,15 μM) ou toxique (1,5 μM) de ouabaïne, tandis que l' E_{net} du traceur est diminuée pour ces deux concentrations dans cette étude. Inversement, McGoron et al. (1996) observent sur cœur isolé de rat une diminution de l' E_{\max} pour des doses de 1 μM et de 50 μM , tandis que l' E_{net} n'est pas affectée pour 1 μM de ouabaïne et diminuée seulement à 3 minutes pour 50 μM .

Enfin, l'effet de la ouabaïne a été évalué *in vivo* chez le chien (Melin 1986). Pour une dose induisant des arythmies, une diminution de la fréquence cardiaque de 3% et une augmentation de la pression sanguine de 16%, la captation de thallium 201 par le ventricule gauche 10 minutes après l'injection n'est pas affectée. Il est donc admis que les digitaliques ne modifient pas la captation du thallium 201 *in vivo*.

b. Débit de perfusion myocardique régional et captation du 201Tl

Strauss et al. (1975) ont montré une corrélation ($r = 0,97$) entre la captation du thallium 201 et le débit de perfusion myocardique estimé par la technique des microsphères radioactives sur un modèle de chien anesthésié avec occlusion partielle de l'artère coronaire Circonflexe (Cx). L'étude de Chu et al. (1982) confirme ces résultats sur un modèle d'infarctus chronique.

Nielsen et al. (1980) ont obtenu une gamme plus étendue de débits coronaires régionaux (de 0,1 à 4,5 ml/min/g) en utilisant un modèle de chien éveillé subissant une occlusion complète de l'artère coronaire Cx et réalisant un exercice physique. Dans ces conditions, la captation du thallium 201 est corrélée au débit coronaire régional ($r = 0,98$ à $0,99$) (Figure 2). Lorsque l'augmentation de débit est induite par un stress pharmacologique (dipyridamole) en présence d'une sténose partielle ou complète de l'artère Cx, la captation régionale du thallium 201 reflète également la répartition du débit de perfusion myocardique ($r = 0,95$ à $0,99$) (Mays 1984). La relation entre captation de thallium 201 et débit sanguin coronaire est identique dans ces deux études. D'autre part, la captation initiale du thallium 201 dans un modèle d'infarctus non-reperfusé chez le chien est également proportionnelle au débit de perfusion, en dépit de la présence de zones nécrosées (Melin 1983).

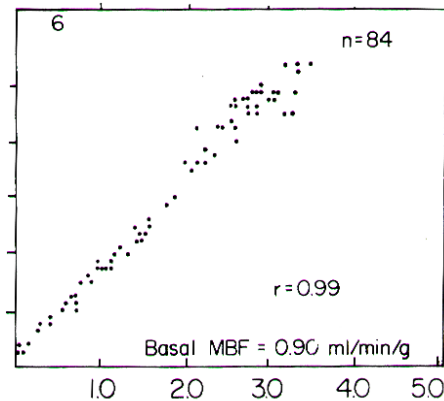


Figure 2. Relation entre l'activité en thallium 201 (ordonnées, cpm/g) et le débit sanguin coronaire régional (abscisses, ml/min/g) chez le chien éveillé effectuant un exercice en présence d'une sténose de l'artère coronaire Cx (Nielsen 1980).

Lorsque la réduction du débit sanguin coronaire est importante (30% ou moins du débit basal), la captation de thallium 201 surestime le débit de perfusion régional (Pohost 1977, Sinusas 1989). Ceci suggère une extraction augmentée du traceur dans les zones peu irriguées. Enfin, pour des débits élevés (supérieurs à 2,5 ml/min/g), la captation du thallium 201 sous-estime le débit de perfusion (Mousa 1990, Glover 1995).

1.4 Elimination myocardique du thallium 201

Après injection intraveineuse, le thallium 201 est capté par le myocarde selon la fraction d'extraction du traceur par cet organe et selon la part du débit cardiaque total allouée à la

circulation coronaire. Typiquement, 2 à 4% de la dose injectée sont captés par le myocarde. De manière générale, la captation du thallium 201 par les autres organes se fait selon le même mécanisme, excepté pour le cerveau (Sapirstein 1958).

Après extraction initiale, le thallium 201 est en échange continu entre le compartiment sanguin et le myocarde. Dans ces conditions, l'activité myocardique décroît au cours du temps (Okada 1982). Ceci correspond au lavage myocardique global du thallium 201. Cette diminution globale de l'activité myocardique résulte du bilan net des mouvements de thallium 201 du myocarde vers le sang (lavage) et inversement (captation). Ce lavage global dépend donc de facteurs indépendants du myocarde, et notamment de la concentration sanguine en thallium 201, déterminée à son tour par les caractéristiques d'extraction et de lavage du thallium 201 des autres organes.

Le lavage myocardique global du thallium 201 doit être distingué du lavage myocardique intrinsèque du traceur. Le lavage intrinsèque est constitué uniquement des mouvements de thallium 201 du myocarde vers le compartiment sanguin. Ceci implique que la concentration circulante en traceur soit nulle afin que les mouvements en retour du thallium 201 soient inexistantes. Dans ces conditions, le lavage myocardique du traceur ne dépend que des caractéristiques intrinsèques du myocarde.

a. Lavage global

La cinétique d'élimination myocardique globale du thallium 201 après injection intraveineuse en conditions normales est de type monoexponentielle. La constante d'élimination $\lambda_{\text{myocarde}}$ est de $0,00176 \pm 0,00054 \text{ min}^{-1}$, correspondant à un $T_{1/2}$ de lavage de $7,3 \pm 2,1$ heures. La décroissance de l'activité sanguine du thallium 201 est triexponentielle. La troisième constante d'élimination λ_3 est identique à celle du myocarde (Figure 3). L'élimination myocardique globale du thallium 201 est donc déterminée par l'élimination sanguine du traceur (Okada 1982).

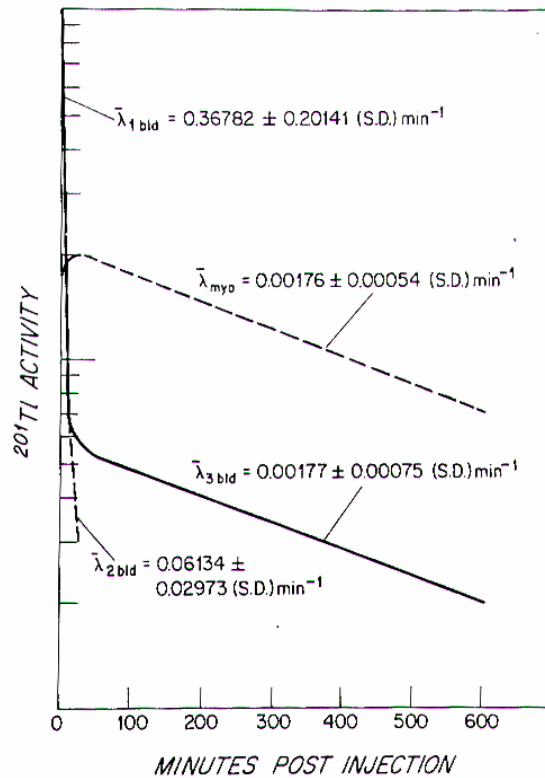


Figure 3. Cinétiques d'élimination myocardique globale (λ_{myo}) et sanguines ($\lambda_{1\text{bld}}$, $\lambda_{2\text{bld}}$, $\lambda_{3\text{bld}}$) du thallium 201 après injection intraveineuse dans le myocarde normal (Okada 1982).

Okada et al. (1982⁽²⁾) ont étudié les cinétiques d'élimination myocardique globale du thallium 201 injecté après infusion intraveineuse de dipyridamole dans le myocarde normal (groupe 1) ou en présence d'une sténose diminuant (groupe 2) ou abolissant (groupe 3) l'effet vasodilatateur du dipyridamole sans diminution du débit coronaire de repos, ou diminuant le débit de repos (groupe 4). Les éliminations myocardique et sanguine du traceur sont de type bi- et triexponentielle, respectivement. La deuxième phase de décroissance myocardique, caractérisée par la constante λ_2 , est identique à la troisième phase de décroissance sanguine dans les zones normales, conformément à l'étude précédente. La constante de décroissance λ_2 diminue lorsque la sévérité de la sténose coronaire augmente, pour atteindre une valeur quasi-nulle dans le groupe 4. Ainsi, la rétention relative de thallium 201 dans un territoire augmente proportionnellement à la sévérité de la sténose coronaire. Sur un modèle de chien subissant une occlusion permanente de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA), Okada et al. (1982⁽²⁾) ont également montré que la cinétique de lavage myocardique global du thallium 201 est ralentie dans les zones ischémiques.

b. Lavage intrinsèque

Grunwald et al. (1981) ont développé une technique permettant l'évaluation du lavage myocardique intrinsèque du thallium 201. Ceci est réalisé par l'injection intracoronaire du traceur. Dans ces conditions, 85% de la dose injectée est captée par le myocarde, contre 2 à 4% lors d'une injection intraveineuse. Compte-tenu de cette forte captation et de la faible quantité de traceur injectée (30 μ Ci versus 0,5 à 1,5 mCi en mode intraveineux), la concentration circulante en thallium 201 peut être considérée comme nulle, au moins pendant deux heures suivant l'injection. Dans ces conditions, l'évolution de la radioactivité myocardique reflète uniquement le passage du thallium 201 du myocarde vers le sang, c'est-à-dire le lavage intrinsèque.

Après injection intracoronaire et élimination rapide du traceur non capté se trouvant dans l'espace interstitiel ($T_{1/2} = 2,25$ min), le contenu myocardique en thallium 201 décroît de manière monoexponentielle. Cette décroissance est plus rapide que celle observée lors d'une cinétique de lavage global ($T_{1/2} = 84,2 \pm 12,5$ min versus $437,2 \pm 126,3$ min, respectivement - Okada 1982). Ceci est dû à l'absence de thallium 201 recirculant après injection intracoronaire, ce qui supprime les mouvements de traceur du sang vers le myocarde. Un résultat important est que le lavage intrinsèque du thallium 201 est ralenti lorsque la pression de perfusion coronaire est diminuée par une sténose de l'artère IVA chez le chien (Figure 4) (Grunwald 1981). Un résultat similaire est mis en évidence par Bergmann et al. (1982) sur un modèle de cœur isolé et perfusé de rat.

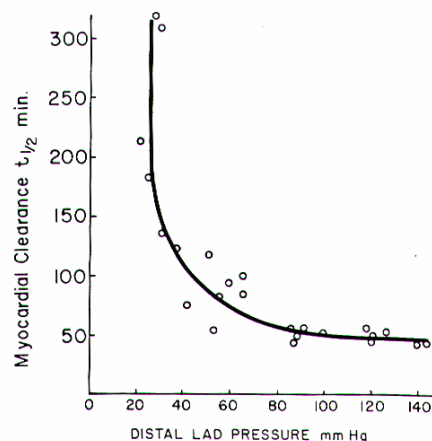


Figure 4. Relation entre le $T_{1/2}$ de lavage intrinsèque et la pression de perfusion coronaire (Grunwald et al., 1981).

1.5 Redistribution du thallium 201

La redistribution est définie comme la résolution totale ou partielle au cours du temps d'une hypofixation initiale après injection du traceur de débit. Dans le cas du thallium 201, cette redistribution a été mise en évidence sur deux types de modèles expérimentaux :

- des modèles d'ischémie transitoire.
- des modèles d'ischémie permanente.

a. Modèles d'ischémie-reperfusion

Les mécanismes à l'origine de cette redistribution sont différents dans les deux modèles.

Sur des chiens soumis à une occlusion de l'artère coronaire gauche pendant 120 minutes, la captation endocardique de thallium 201 injecté après 10 minutes d'occlusion et mesurée à l'issue du protocole dans les zones ischémiques représente $15 \pm 5\%$ de la captation dans la zone non-ischémique. Lorsque l'occlusion est levée 10 minutes après l'injection du traceur, cette même fixation s'élève 100 minutes plus tard à $56 \pm 5\%$ de la captation dans la zone non-ischémique (Pohost 1977). Ceci met en évidence le phénomène de redistribution du thallium 201 sur un modèle d'ischémie transitoire. Ces résultats sont confirmés par Schwartz et al. (1978). La cinétique de redistribution du thallium 201 injecté lors d'une ischémie de 20 minutes suivie d'une reperfusion indique une augmentation nette de la concentration en thallium 201 dans les zones reperfusées et une diminution de cette concentration dans les zones normales. Après 4 à 6 heures de reperfusion, le rapport des concentrations en thallium 201 dans la zone normale par rapport à la zone reperfusée est proche de 1 tandis qu'il est égal à 5 lors de la levée de l'occlusion (Beller 1980) (Figure 5). Le $T_{1/2}$ de lavage de la zone normale est de 7,2 heures, identique à celui décrit par Okada et al. (1982).

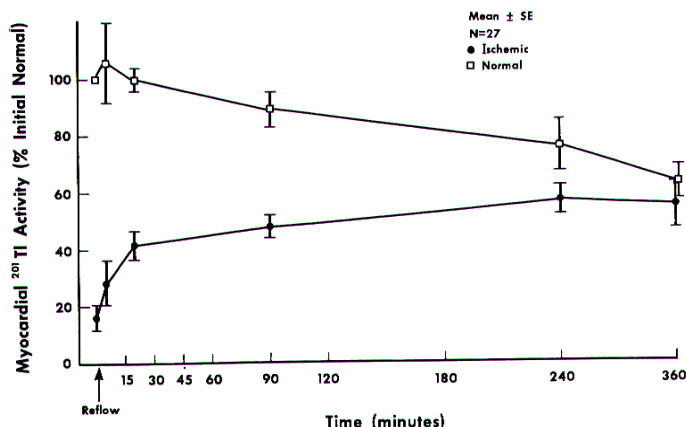


Figure 5. Evolution de l'activité en thallium 201 au cours de la reperfusion dans la zone normale et dans la zone précédemment ischémique après injection intraveineuse du traceur durant l'ischémie (Beller 1980).

Sur un modèle d'ischémie transitoire, la redistribution du thallium 201 est donc due à :

- une accumulation du traceur dans les zones reperfusées,
- un lavage du traceur des zones normales.

En effet, en raison de la diminution de débit, la concentration intracellulaire initiale en thallium 201 dans les cellules de la zone ischémique est inférieure à celle des cellules de la zone saine. Lors de la restauration du débit, les cellules précédemment ischémiques sont en présence d'une concentration circulante de traceur permettant un influx net de thallium 201, tandis que ce gradient est favorable à un efflux net de traceur dans la zone normale, dont la concentration intracellulaire en thallium 201 est supérieure à celle de la zone ischémique.

b. Modèles d'ischémie permanente

Le phénomène de redistribution du thallium 201 a également été observé sur des modèles expérimentaux dans lesquels le débit est diminué de manière permanente.

Pohost et al. (1981) ont étudié la relation entre le débit sanguin coronaire et la captation de thallium 201 sur des chiens présentant une occlusion permanente de l'artère IVA. Il existe une relation linéaire entre le débit mesuré lors de l'injection du traceur et l'activité en thallium 201 10 minutes, 2 heures et 4 heures après l'injection. Le phénomène de redistribution est mis en évidence par la diminution progressive au cours du temps de la pente de la droite de régression linéaire corrélant le débit de perfusion régional à l'activité en thallium 201 (Figure 6). Ceci révèle une normalisation de la concentration en traceur dans les zones ischémiques par rapport aux zones saines. Cette normalisation est due à une augmentation nette de la

quantité de thallium 201 dans les zones modérément à sévèrement ischémiques, et à une diminution nette de cette quantité dans les zones normoperfusées (Figure 6). Des résultats similaires sont décrits par Gerry et al. (1980).

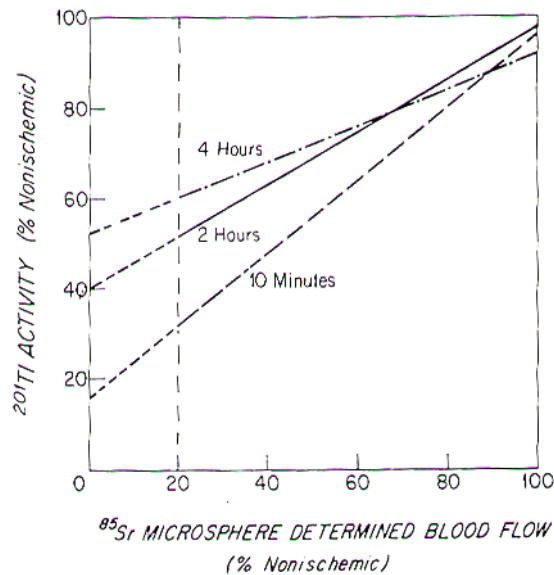


Figure 6. Droites de régression linéaire corrélant l'activité en thallium 201 au débit de perfusion chez des chiens sacrifiés 10 minutes, 2 heures ou 4 heures après l'injection du traceur en présence d'une sténose permanente de l'artère IVA (Pohost 1981).

Sur un modèle d'ischémie permanente, le phénomène de redistribution du thallium 201 existe. Il est dû à :

- une accumulation du traceur dans les zones ischémiques,
- un lavage du traceur des zones normales.

Les mécanismes supposés conduisant à ce résultat sont différents de ceux évoqués dans le cadre d'une redistribution survenant suite à une restauration du débit. En effet, l'influx net de thallium 201 dans les cellules de la zone ischémique ne peut provenir d'une augmentation de la quantité de thallium présentée à ces cellules puisque le débit est chroniquement diminué. Pour que la concentration intracellulaire en traceur augmente, la seule possibilité est alors que sa sortie cellulaire soit ralentie. Si la vitesse de lavage cellulaire du thallium 201 est inférieure à la vitesse de captation, la concentration intracellulaire en traceur augmente. L'étude précédemment citée de Grunwald et al. (1981) semble confirmer cette hypothèse puisque le lavage intrinsèque du thallium 201 est fortement diminué immédiatement après l'installation d'une sténose coronaire. Cette diminution permettrait l'accumulation du traceur dans les

zones ischémiques malgré une captation également diminuée. Ainsi, le thallium 201 redistribue même en présence d'une diminution permanente du débit sanguin coronaire car la vitesse de lavage intrinsèque du traceur est diminuée dans ces conditions.

1.6 Conclusion

Le thallium 201 est un cation hydrophile analogue du potassium pénétrant dans les cellules grâce à la Na/K ATPase et au cotransport Na/K/2Cl. Cette captation est donc dépendante de l'état métabolique des cellules.

La fraction d'extraction myocardique du traceur *in vivo* est élevée. Elle est diminuée lorsque le débit de perfusion augmente. La captation myocardique du thallium 201 n'est pas modifiée par la ouabaïne. Cette captation reflète la perfusion régionale sur une large gamme de débits. Le traceur présente un phénomène de redistribution : l'hypofixation initiale de thallium 201 dans une zone peut disparaître au cours du temps. Ce phénomène est utilisé en pratique clinique pour la détection de territoires ischémiques viables. Le thallium 201 est le traceur de débit le plus utilisé à l'heure actuelle.

2. Les traceurs technétiés

Si le comportement biologique du thallium 201 en fait le traceur radioactif de la perfusion myocardique le plus utilisé à l'heure actuelle, ses caractéristiques physiques suboptimales ont orienté les recherches vers la mise au point de nouveaux traceurs présentant une énergie d'émission mieux adaptée aux gamma-caméras et entraînant une dosimétrie moindre. Le technétium-99m est un radioélément satisfaisant ces exigences.

2.1 Caractéristiques physiques du technétium-99m

Le technétium-99m est un émetteur gamma pur possédant une énergie d'émission de 140 keV optimale pour la détection externe par les gamma-caméras. De plus, sa demi-vie de 6,03 heures entraîne une irradiation du patient inférieure à celle du thallium 201, et permet l'injection de doses plus importantes de radioactivité. Enfin, le coût de production du technétium-99m est très inférieur à celui du thallium 201, et sa disponibilité est meilleure.

Plusieurs complexes technétiés ont été synthétisés, issus de familles chimiques différentes. Nous examinerons dans ce chapitre le comportement biologique des 3 principaux complexes décrits à l'heure actuelle, commercialisés ou en cours de développement : Tc-Mibi, Teboroxime et Tetrofosmine. Nous ferons ensuite le bilan des études expérimentales réalisées sur $^{99m}\text{TcN-NOET}$ à ce jour.

2.2 Tc-Mibi

a. Mécanismes de captation cellulaire du Tc-Mibi

Le Tc-Mibi (hexakis (2-methoxy isobutylisonitrile) technétium-99m) est un complexe cationique lipophile appartenant à la famille des isonitriles (Jones 1984). La cinétique de captation cellulaire sur cardiomyocytes d'embryons de poulets indique un $T_{1/2}$ de captation de $9,3 \pm 1,5$ minutes (Piwnica-Worms 1990). L'équilibre entre les concentrations en traceur intra- et extracellulaire est atteint à la 40^{ème} minute d'incubation avec les cellules. Le $T_{1/2}$ de lavage sur ce type cellulaire est de 8 ± 2 minutes.

L'annulation de la différence de potentiel (ddp) membranaire par une concentration extracellulaire en potassium identique à la concentration intracellulaire (130 mM) entraîne une diminution de 85% environ de la captation du Tc-Mibi (Figure 7) (Piwnica-Worms 1990⁽²⁾). Ceci indique que la captation cellulaire du traceur dépend du potentiel membranaire. Le mécanisme admis de captation cellulaire du Tc-Mibi est une diffusion à travers la membrane cellulaire grâce à sa lipophilie et une accumulation intracellulaire grâce à sa charge positive et à la ddp membranaire négative. Ces caractéristiques de captation cellulaire font du Tc-Mibi un outil potentiel pour la mesure d'une ddp transmembranaire, en utilisant le rapport des concentrations intra- et extracellulaires du traceur et l'équation de Nernst (Chernoff 1993).

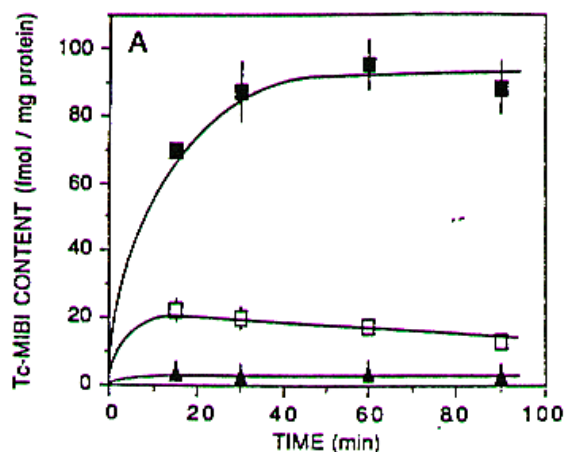


Figure 7. Cinétique de captation cellulaire du Tc-Mibi en conditions normales (carrés noirs) et en présence d'une solution contenant 130 mM de potassium (carrés blancs) (Piwnica-Worms 1990).

(a) Localisation intracellulaire

Lorsqu'un découplant mitochondrial, le CCCP, est utilisé, la captation du Tc-Mibi est inhibée de $90 \pm 3\%$. Le CCCP est un protonophore qui annule la ddp transmembranaire mitochondriale. Inversement, l'inhibition de la F₀/F₁ ATP synthase mitochondriale, qui conduit à une hyperpolarisation du potentiel membranaire mitochondrial, augmente la captation du traceur (Piwnica-Worms 1990). De même, le tétraphénylborate (TPB) augmente la vitesse de captation et la captation nette du Tc-Mibi d'un facteur 3 et 4 respectivement ; cet effet est totalement inhibé par le CCCP (Piwnica-Worms 1991). Le TPB est un anion hydrophobe qui s'adsorbe dans les membranes cellulaires et augmente la conductance membranaire des molécules cationiques lipophiles. L'ensemble de ces résultats indique qu'après pénétration intracellulaire, le Tc-Mibi s'accumule dans les mitochondries grâce à la ddp mitochondriale fortement négative. Une étude de distribution subcellulaire réalisée à partir d'homogénats de cœurs de rats précédemment isolés et perfusés avant injection de Tc-Mibi indique que 90% du traceur capté se trouve dans la mitochondrie, sous forme libre (Carvalho 1992). Ce dernier point est confirmé par une étude en résonance magnétique nucléaire du ⁹⁹Tc (Piwnica-Worms 1994).

Sur plusieurs types cellulaires, la captation à l'équilibre du Tc-Mibi est plus importante que celle du thallium 201. Ainsi, le rapport de captation des deux traceurs est de 5 (Piwnica-

Worms 1992) à 20 (Caldwell 1992) sur cardiomyocytes d'embryons de poulets, de 3,4 sur cellules musculaires lisses (Nakamura 1996) et de 2 sur cellules endothéliales (Caldwell 1992). A l'inverse, les captations du Tc-Mibi et du thallium 201 ne sont pas significativement différentes sur fibroblastes.

D'autre part, la captation du Tc-Mibi sur cardiomyocytes est 10 (Chiu 1990) à 40 (Caldwell 1992) fois supérieure à la captation observée sur fibroblastes, et 10 fois supérieure à celle observée sur cellules endothéliales (Caldwell 1992). Ces différences sont attribuées à des ddp transmembranaires sarcolemmale et mitochondriale et à des volumes mitochondriaux supérieurs pour les cardiomyocytes par rapport aux autres types cellulaires.

(b) Inhibitions métaboliques - hypoxie

La captation nette de Tc-Mibi est inhibée par une incubation avec l'acide iodoacétique associé à la roténone qui déplete totalement l'ATP intracellulaire. Cette inhibition est supérieure à celle observée pour le thallium 201 dans les mêmes conditions (Piwnica-Worms 1992).

Cependant, contrairement au thallium 201 dont la vitesse initiale de captation décroît régulièrement au cours d'une inhibition métabolique, la vitesse initiale de captation du Tc-Mibi est de $144,1 \pm 8,0\%$ du contrôle 10 à 20 minutes après le début de l'inhibition métabolique. L'ATP intracellulaire est alors complètement dépleté. Cette augmentation de la vitesse de captation est due à une hyperpolarisation de la ddp sarcolemmale, puisque le potassium 130 mM inhibe l'augmentation tandis que le CCCP est sans effet. Cette hyperpolarisation est due notamment à :

- l'activation des canaux potassiques (I_k),
- l'activation des canaux potassiques ATP-dépendants ($I_{k, ATP}$),
- l'activation des canaux potassiques sensibles à l'acide arachidonique ($I_{k, AA}$). En effet, le baryum, la glybenclamide et la quinacrine, respectivement inhibiteurs du courant I_k , du courant $I_{k, ATP}$ et de la phospholipase A2, inhibent en partie l'augmentation de la vitesse de captation du Tc-Mibi.

Lorsque l'intégrité cellulaire n'est plus maintenue, la captation cellulaire du Tc-Mibi est quasi-nulle (Piwnica-Worms 1992).

b. Captation myocardique du Tc-Mibi

(a) Cinétique de captation et fraction d'extraction

Après injection intraveineuse, le pic de fixation myocardique du Tc-Mibi est atteint en 1 minute chez le chien dans les zones normo- ou hypoperfusées (Okada 1988, Glover 1990). Sur cœur isolé de lapin, la fraction d'extraction maximale (E_{max}) du Tc-Mibi pour des débits coronaires compris entre 0,52 et 3,19 ml/min/g est de $0,38 \pm 0,09$ en moyenne. Cette valeur est nettement inférieure à celle du thallium 201 ($0,73 \pm 0,10$). La valeur de E_{max} est inversement proportionnelle au débit coronaire (Leppo 1989) ; elle est moins sensible aux variations du débit coronaire que celle du thallium 201 (Marshall 1990). L'hypoxie et la ouabaïne sont sans effet sur l'extraction maximale du Tc-Mibi.

In vivo chez le porc, la fraction d'extraction du Tc-Mibi ($65,5 \pm 2,5\%$) est également inférieure à celle du thallium 201 ($82 \pm 3\%$). Une valeur similaire ($68,3 \pm 4,7\%$) a été retrouvée chez le chien (Glover 1997). Cette valeur diminue lorsque le débit de perfusion augmente (Mousa 1990).

(b) Débit de perfusion myocardique régional et captation de Tc-Mibi

Il existe une relation linéaire ($r = 0,87$ à $0,99$) entre la captation myocardique du Tc-Mibi et le débit de perfusion régional chez le chien subissant une occlusion complète ou partielle de l'artère coronaire IVA ou Cx accompagnée ou non d'un stress pharmacologique (Figure 8 pour exemple) (Okada 1988, Li 1988, Sinusas 1989, Mousa 1990, Glover 1990).

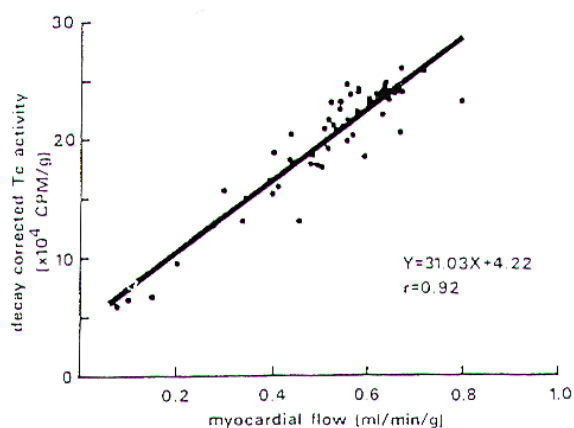


Figure 8. Corrélation entre le débit de perfusion myocardique et la captation régionale du Tc-Mibi en présence d'une occlusion partielle de l'artère Cx (Okada 1988).

Cependant, la captation du Tc-Mibi surestime les bas débits de perfusion (Sinusas 1989, Glover 1990). Cette surestimation est supérieure à celle observée pour le thallium 201 (Glover 1995⁽²⁾). D'autre part, lorsque le débit coronaire basal est augmenté d'un facteur 5 à 6 par perfusion intracoronaire d'adénosine, la captation du Tc-Mibi n'est augmentée que d'un facteur 2,4 environ (Glover 1995⁽²⁾). Cette sous-estimation des hauts débits est plus marquée que celle du thallium 201 observée dans les mêmes conditions (Figure 9) (Melon 1992, Glover 1995).

La relation entre débit de perfusion et captation de Tc-Mibi est altérée lors d'un stress induit par la dobutamine. La dobutamine a pour effet d'activer la captation de calcium par la mitochondrie. La diminution de la ddp mitochondriale qui en résulte est probablement la cause de cette altération (Calnon 1997). En effet, le rouge de ruthénium, un inhibiteur de l'entrée du calcium dans la mitochondrie, améliore la fraction d'extraction du Tc-Mibi et la corrélation entre la captation du traceur et le débit de perfusion sous dobutamine chez le chien (Calnon 1997⁽²⁾).

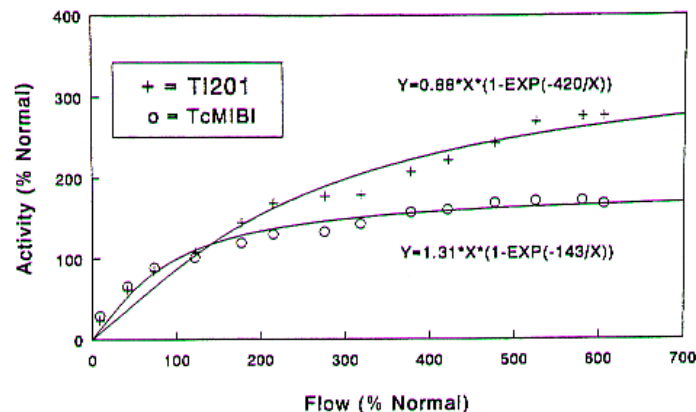


Figure 9. Corrélation entre l'activité en thallium 201 ou en Tc-Mibi et le débit de perfusion régional lors d'un stress pharmacologique induit par l'adénosine en présence d'une sténose sévère de l'artère IVA (Glover 1995⁽²⁾).

Lorsque le Tc-Mibi est injecté lors d'une reperfusion suivant 15 ou 120 minutes d'occlusion de l'artère IVA, sa captation après 15 minutes dans le territoire précédemment ischémique est toujours corrélée au débit régional (Sinusas 1989, Canby 1990). Lorsque l'occlusion est suffisamment longue pour entraîner une nécrose cellulaire, la captation du Tc-Mibi dans la zone nécrotique est faible malgré la restauration du débit (Freeman 1991).

c. Elimination myocardique du Tc-Mibi

Sur cœur isolé de lapin, la rétention myocardique du Tc-Mibi est plus importante que celle du thallium 201 et sa cinétique de lavage est moins sensible aux variations du débit coronaire (Marshall 1990).

Chez le chien, l'élimination myocardique du Tc-Mibi en conditions normales est faible, de l'ordre de 11 à 15 % en 4 heures (Okada 1988, Glover 1990). Cette cinétique d'élimination myocardique n'est pas modifiée dans le myocarde ischémique non-infarci, reperfusé ou non (Okada 1988, Glover 1990, Okada 1995). En revanche, lorsque l'occlusion de l'artère coronaire entraîne l'apparition d'une zone infarctie, la reperfusion induit une diminution de la rétention endocardique et transmurale du Tc-Mibi de 60 et 50% respectivement par rapport à la zone non-ischémique (Beller 1993). Ceci traduit un lavage accéléré du traceur des zones nécrosées au cours de la reperfusion. Cette cinétique de lavage accélérée est également retrouvée dans le myocarde infarci non reperfusé (Okada 1995⁽²⁾). Le Tc-Mibi n'est donc pas retenu dans les zones nécrotiques.

d. Redistribution du Tc-Mibi

Les premières études réalisées ne mettaient pas en évidence de phénomène de redistribution du Tc-Mibi. En effet :

- Sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez le chien, le rapport des concentrations en Tc-Mibi dans la zone ischémique par rapport à la zone saine durant l'occlusion (= 0,20) n'est pas différent de celui mesuré après 3 heures de reperfusion (= 0,24) (DeCoster 1990).
- Sur un modèle d'ischémie permanente, le rapport de l'activité associée au Tc-Mibi dans la zone ischémique par rapport à la zone saine mesuré après 4 heures d'occlusion (= 0,53 ± 0,19) n'est pas différent du rapport des débits de perfusion dans ces deux zones évalué au début de l'occlusion (= 0,47 ± 0,20) (Okada 1988).

Ces résultats ont été infirmés par la suite :

- Sur un modèle d'ischémie-reperfusion, Canby et al. (1990) ont observé une augmentation identique de l'activité du thallium 201 et du Tc-Mibi par rapport au débit de perfusion dans les territoires modérément ischémiques après 35 minutes de reperfusion. Sur un modèle de chien subissant 6 minutes d'occlusion de l'artère IVA suivies de 3 heures de reperfusion, Li et

al. (1990) ont mis en évidence une augmentation de 57% de l'activité du Tc-Mibi dans les zones précédemment ischémiques et une diminution de 19% de l'activité dans les zones normales au terme de la reperfusion. Cette redistribution est cependant nettement inférieure à celle du thallium 201 (Figure 10). La redistribution du Tc-Mibi lors d'une ischémie-reperfusion a également été mise en évidence par Mehri et al. (1994).

- Sur un modèle d'ischémie permanente, Sinusas et al. (1994) ont également mis en évidence une redistribution du Tc-Mibi après 3 heures d'ischémie. Cette redistribution est également inférieure à celle du thallium 201. Ces résultats sont confirmés par Sansoy et al. (1995).

Le Tc-Mibi redistribue en situation d'ischémie-reperfusion et d'ischémie permanente. Cependant, ce phénomène est beaucoup moins marqué que pour le thallium 201. Les mécanismes permettant cette redistribution ne sont pas clairs, car l'activité sanguine du traceur décroît très rapidement selon un mode biexponentiel après l'injection. Ce phénomène de redistribution n'est pas exploitable en pratique clinique.

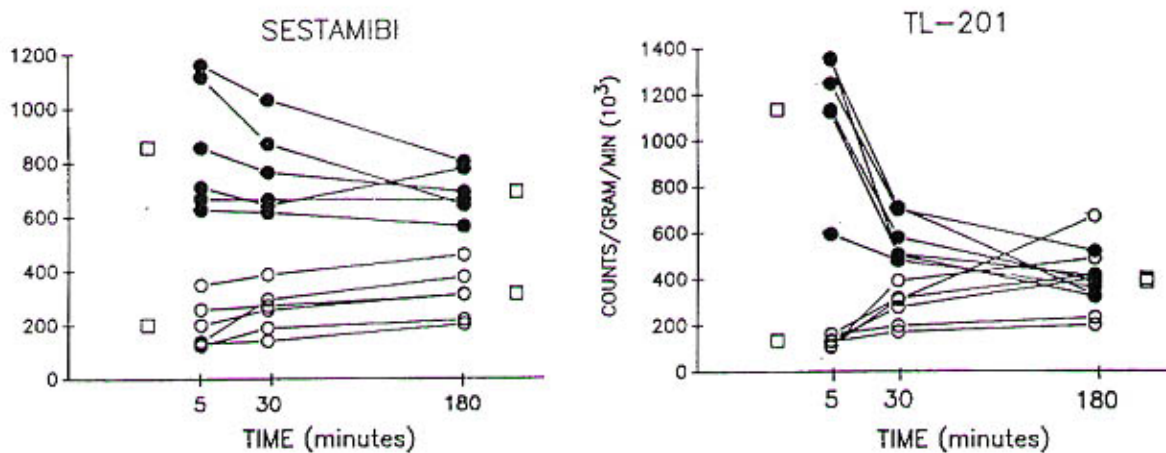


Figure 10. Évolution de l'activité du Tc-Mibi et du thallium 201 au cours du temps dans les zones normales (cercles noirs) et ischémiques (cercles blancs). Les traceurs sont injectés par voie intraveineuse lors d'une occlusion coronaire. Cette occlusion est levée 5 minutes plus tard (Li 1990).

e. Conclusion

Le Tc-Mibi est un complexe cationique diffusant à travers les membranes cellulaires et s'accumulant dans les mitochondries grâce à sa charge positive et à la forte ddp

mitochondriale. Cette captation est donc réalisée tant que le gradient électrique est maintenu de part et d'autre du sarcolemme et de la membrane mitochondriale interne.

La fraction d'extraction myocardique du Tc-Mibi est inférieure à celle du thallium 201. Elle est moins sensible aux variations du débit sanguin coronaire. La captation régionale du Tc-Mibi est corrélée au débit de perfusion. La disparité des débits est cependant moins bien appréciée qu'avec le thallium 201. La redistribution du Tc-Mibi est trop faible pour être exploitable cliniquement.

2.3 Teboroxime

a. Mécanismes de captation cellulaire de la teboroxime

La teboroxime (chloro (methylboron – tris [1,2 - cyclohexanedionedioxy] N, N', N'', N''', N''''', N''''''') technétium-99m) est un complexe neutre et lipophile (coefficient de partage octanol/eau = 39800 à pH 7,4 et 20°C) de la famille des BATO (**B**oronic acid **A**dducts of **T**echnetium **d**i**O**ximes).

Sur cardiomyocytes de rats nouveau-nés, le $T_{1/2}$ de captation est inférieur à 2 minutes. Le plateau de captation est atteint en moins de 10 minutes. Le rapport des concentrations cellulaire et extracellulaire est alors de 585 ± 66 . Le $T_{1/2}$ de lavage est de 13 minutes (Maublant 1989).

Les inhibiteurs métaboliques (IAA, cyanure, CCCP, rotenone) affectent peu la fixation cellulaire de la teboroxime (Maublant 1989, Kronauge 1992, Maublant 1993). A la différence du thallium 201 et du Tc-Mibi, la teboroxime ne présente pas de différence de fixation d'un type cellulaire à un autre (Kronauge 1992, Maublant 1993⁽²⁾). Le fait de lyser les cellules par choc osmotique n'affecte pas la fixation du traceur, tandis qu'une diminution de la température de 37°C à 0°C diminue la fixation de la molécule de 70 %. Ces résultats indiquent que la fixation de la teboroxime n'est pas dépendante du métabolisme cellulaire, et suggèrent que cette fixation consiste en une répartition non-spécifique sur les membranes cellulaires en raison de la forte lipophilie du traceur.

b. Captation myocardique de la teboroxime

(a) Cinétique de captation et fraction d'extraction

Une minute après injection intraveineuse chez le rat, la captation cardiaque de la teboroxime représente $3,44 \pm 0,32$ % de la dose injectée par gramme d'organe (%DI/g). Cette valeur est supérieure à celle du thallium 201 observée dans les mêmes conditions ($3,03 \pm 0,13$ %DI/g) (Narra 1989).

Sur cœur isolé de lapin avec recirculation du liquide de perfusion, l'extraction maximale de la teboroxime est supérieure à celle du thallium 201 ($0,71 \pm 0,09$ versus $0,57 \pm 0,10$, Leppo 1990). Cette tendance est confirmée par Rumsey et al. (1992). Leppo et al. (1990) observent une diminution de l'Emax de la teboroxime lorsque le débit de perfusion augmente. En revanche, Marshall et al. (1991) n'observent pas de variation de l'extraction maximale du traceur en fonction du débit. La fraction d'extraction de la teboroxime chez le chien est de 88 ± 5 % pour un débit de perfusion de 0,93 ml/min/g et de 91 ± 3 % pour un débit de 4,2 ml/min/g (Stewart 1990). L'extraction myocardique initiale de la teboroxime est donc peu affectée par des variations du débit de perfusion. Ce traceur est donc théoriquement plus adapté pour apprécier une hétérogénéité du débit coronaire que le thallium 201.

L'extraction myocardique de la teboroxime sur cœur isolé et perfusé diminue lorsque le traceur est préincubé avec du sang total *in vivo* (Rumsey 1992) ou avec des globules rouges *in vitro* (Dahlberg 1994) avant son injection. Cette diminution a deux explications :

- La teboroxime se lie aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques. En effet, 98% et 35% de la teboroxime sont sous forme liée 60 minutes après incubation dans du sang total *in vivo* et *in vitro*, respectivement. La plus forte valeur observée *in vivo* est due à l'élimination continue du traceur libre circulant, notamment par le foie. La liaison du traceur aux éléments sanguins diminue l'extraction myocardique de la molécule. Cependant, l'affinité de la teboroxime pour les protéines plasmatiques est plus faible que son affinité pour les cellules sanguines (Rosenspire 1993). Une certaine extraction de la teboroxime fixée sur ces protéines est donc possible (Rumsey 1992).
- La teboroxime est modifiée en présence du sang, un groupement chlorure étant remplacé par un groupement hydroxyle. Ce dernier composé présente une extraction myocardique moins élevée que la teboroxime.

(b) Débit de perfusion myocardique régional et fixation de la teboroxime

L'avantage théorique de la teboroxime par rapport au thallium 201 pour l'appréciation d'une disparité dans le débit de perfusion n'est pas exploitable en pratique en raison des cinétiques myocardiques extrêmement rapides du traceur. En effet :

- **30 secondes** après injection intraveineuse de teboroxime chez le chien subissant une occlusion de l'artère IVA, il existe une corrélation ($r = 0,74$) entre le rapport des concentrations en traceur mesuré par détection externe dans la zone ischémique et dans la zone saine, et le rapport des débits dans ces deux zones.
- **1 minute** après injection, Beanlands et al. (1992) ont montré une excellente corrélation entre le débit régional et la fixation de teboroxime. Cette relation reste linéaire pour des débits allant jusqu'à 4,5 ml/min/g.
- **70 secondes** après injection sur le même modèle d'occlusion de l'artère IVA simultanément à l'infusion d'un vasodilatateur, la teboroxime apprécie légèrement mieux que le thallium 201 l'hétérogénéité du débit (Di Rocco 1992).
- **2 minutes** après injection, la teboroxime et le thallium 201 surestiment le rapport des débits zone ischémique / zone saine. La surestimation induite par la teboroxime est significativement supérieure à celle du thallium 201 (Figure 11) (Glover 1995⁽²⁾). Cette relation s'accroît à **4 minutes** en présence d'une sténose abolissant complètement la réserve coronaire. De plus, la sous-estimation des hauts débits est plus marquée pour la teboroxime à 2 minutes comme à 4 minutes.
- **5 minutes** après l'injection, Beanlands et al. (1992) observent que la relation entre la fixation de la teboroxime et le débit de perfusion n'est linéaire que pour des valeurs allant jusqu'à 2,5 ml/min/g.

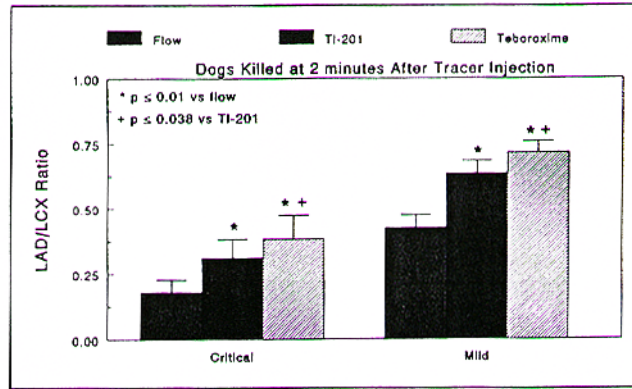


Figure 11. Comparaison des rapports de débits avec les rapports des activités en thallium 201 et en teboroxime dans la zone ischémique par rapport à la zone saine 2 minutes après injection intraveineuse des traceurs en présence d'une sténose moyenne ou sévère de l'artère IVA (Glover 1995⁽²⁾).

c. Elimination myocardique de la teboroxime

La cinétique de lavage *in vivo* de la teboroxime est beaucoup plus rapide que celle du thallium 201 : Narra et al. (1989) observent une activité cardiaque supérieure à celle du thallium 201 une minute après l'injection, puis inférieure à cette valeur 5 minutes après l'injection.

Après injection intracoronaire chez le chien, la cinétique de lavage myocardique de la teboroxime est biexponentielle. La première composante de cette décroissance concerne $67 \pm 11\%$ de l'activité myocardique en traceur et est sensible au débit de perfusion ($T_{1/2} = 2,3 \pm 0,6$ min au repos et $1,5 \pm 0,3$ minutes sous dipyridamole) : le lavage de la teboroxime est accéléré lorsque le débit de perfusion augmente. La deuxième composante concerne $18 \pm 8\%$ de l'activité myocardique ($T_{1/2} = 20 \pm 9$ minutes) et est insensible aux variations de débit. Une cinétique de lavage biexponentielle est également retrouvée après injection intraveineuse. La première composante présente un $T_{1/2}$ compris entre $4,5 \pm 0,9$ minutes (Johnson 1993) et $11,9 \pm 1,8$ minutes (Stewart 1991). Cette première phase est sensible aux variations de débit (Stewart 1991). La deuxième composante possède un $T_{1/2}$ de $160,7 \pm 35,9$ minutes. Elle est insensible aux variations de débit (Johnson 1993).

d. Redistribution de la teboroxime

Lors d'un stress pharmacologique en présence d'une sténose d'une artère coronaire, la cinétique de lavage de la teboroxime est ralentie dans les zones ischémiques par rapport aux

zones normoperfusées (Gray 1991, Stewart 1991, Beanlands 1992). Ces cinétiques de lavage différentielles sont également observées en l'absence de stress pharmacologique dans le contexte d'une sténose coronaire diminuant le débit de repos (Johnson 1993). Ce phénomène permet l'observation d'une "redistribution" du traceur : la concentration en teboroxime diminuant plus rapidement dans les zones normales que dans les zones ischémiques, le rapport d'activité entre ces deux zones, supérieur à 1 immédiatement après l'injection, se normalise au cours du temps (Figure 12).

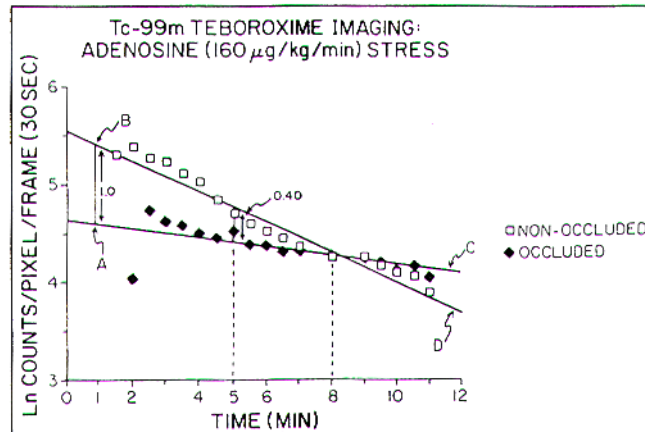


Figure 12. Cinétiques de lavage cardiaque de la teboroxime dans la zone ischémique et dans la zone saine suivie par détection externe de la radioactivité après injection intraveineuse en présence d'une sténose coronaire et d'un stress pharmacologique (Stewart 1991).

Johnson et al. (1994, 1995) ont montré que la rétention différentielle de la teboroxime pouvait mettre en évidence des sténoses coronaires de sévérité différentes. Ainsi :

Dans le contexte d'une ischémie-reperfusion, la "redistribution" de la teboroxime n'est pas observée. En effet, le débit étant restauré, les cinétiques de lavage dans la zone saine et dans la zone précédemment ischémique sont identiques. Le rapport d'activité reste donc constant au cours du temps (Gray 1991).

Dans le contexte d'une ischémie permanente, la "redistribution" de la teboroxime est observée. Cette redistribution est due à :

- un lavage rapide du traceur des zones normales,
- un lavage ralenti du traceur des zones ischémiques consécutif à la diminution du débit.

e. Conclusion

La teboroxime est un complexe neutre et lipophile. Sa fixation cellulaire se fait par répartition non-spécifique sur les membranes cellulaires grâce à sa forte lipophilie. Cette captation n'est donc pas dépendante de l'état métabolique des cellules.

La fraction d'extraction du traceur est similaire à celle du thallium 201. Elle ne diminue pas lorsque le débit de perfusion augmente. Très tôt après l'injection, la corrélation entre la fixation régionale de la teboroxime et le débit de perfusion est très bonne. Cependant, cette relation s'altère rapidement à cause de la cinétique d'élimination myocardique très rapide du traceur. Un phénomène de « redistribution » est observé. Il est dû à des cinétiques de lavage différentes dans les zones ischémiques et dans les zones saines. Il est trop rapide pour être exploitable cliniquement.

2.4 Tetrofosmine

a. Mécanismes de captation cellulaire de la tetrofosmine

La tetrofosmine (1,2 bis[bis(2-ethoxyethyl)phosphino]ethane) est un complexe cationique lipophile. Sur cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte, le $T_{1/2}$ de captation est de 21 minutes environ. L'équilibre de captation est atteint après 60 minutes. La proportion de traceur capté à l'équilibre est similaire à celle du Tc-Mibi, et supérieure à celle du thallium 201. La ressortie cellulaire est lente puisqu'il reste 60% de l'activité initiale après 90 minutes de lavage (Platts 1995).

En raison de ses propriétés physico-chimiques, le mécanisme supposé de captation cellulaire de la tetrofosmine est identique à celui du Tc-Mibi. Younès et al. (1995) ont montré que le complexe est susceptible de diffuser à travers une membrane en réponse à une ddp transmembranaire. Cependant, une annulation de la ddp sarcolemmale avec une solution contenant 130 mM de potassium inhibe moins fortement la captation de la molécule que celle du Tc-Mibi (Bernard 1998). De plus, le vérapamil, inhibiteur des canaux calciques, diminue la captation de la tetrofosmine de 40% sur cellules musculaires lisses sans altérer celle du Tc-Mibi (Nakamura 1996).

Après pénétration intracellulaire, la proportion de tetrofosmine diffusant vers la mitochondrie semble moins importante que celle du Tc-Mibi puisqu'un découplant mitochondrial, le CCCP, diminue de 50 à 70% la rétention intracellulaire du Tc-Mibi et de 30% seulement celle

de la tetrofosmine (Arbab 1998). Le devenir intracellulaire exact de la tetrofosmine reste à mettre en évidence.

b. Captation myocardique de la tetrofosmine

(a) Cinétique de fixation et fraction d'extraction

La fixation cardiaque de la tetrofosmine chez le rat représente $1,58 \pm 0,09$ %DI à 2 minutes. Elle est stable jusqu'à 60 minutes, où elle représente $1,53 \pm 0,13$ %DI (Kelly 1993). Ces valeurs sont inférieures à celles du thallium 201.

L'extraction maximale du traceur sur cœur isolé de rat est inférieure à celle du thallium 201 ($0,30 \pm 0,01$ versus $0,70 \pm 0,09$) (Takahashi 1997). La fraction d'extraction chez le chien est de $54,0 \pm 3,7\%$, inférieure à celle du Tc-Mibi mesurée dans les mêmes conditions ($68,3 \pm 4,7\%$) (Glover 1997).

(b) Débit de perfusion myocardique régional et captation de la tetrofosmine

En présence d'une sténose de l'artère IVA diminuant le débit de repos et d'un stress pharmacologique induit par le dipyridamole ou l'adénosine chez le chien, il existe une relation linéaire entre la captation myocardique de la tetrofosmine 15 minutes après l'injection et le débit sanguin coronaire ($r = 0,71$ à $0,94$) pour des débits allant jusqu'à 2 ml/min/g (Figure 13) (Sinusas 1994(2)). Cette relation est retrouvée pour une gamme de débits plus étendue chez le chien subissant un stress pharmacologique associé à une sténose diminuant ou abolissant la réserve coronaire. Cependant, la tetrofosmine apprécie moins bien que le thallium 201 la disparité des débits, avec un plateau de captation atteint pour des valeurs de débits plus faibles, et une surestimation des bas débits de perfusion supérieure à celle du thallium 201 (Glover 1997). Ceci conduit à des tailles observées de défauts de la zone ischémique inférieures avec la tetrofosmine par rapport au thallium 201 en imagerie ex vivo de tranches de ventricule gauche.

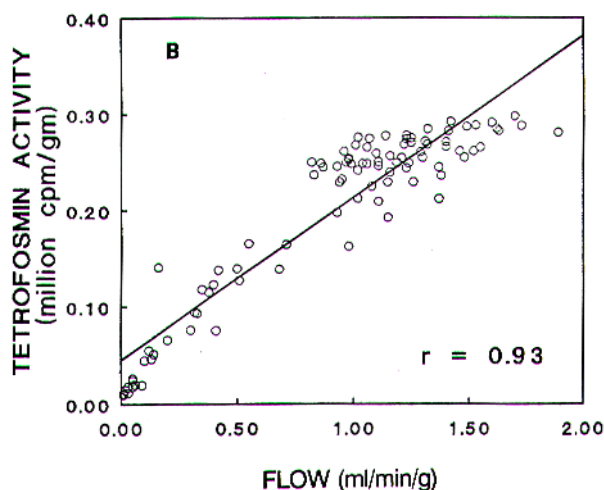


Figure 13. Relation entre l'activité en tetrafosmine et le débit sanguin coronaire régional 15 minutes après l'injection intraveineuse du traceur en présence d'une occlusion complète de l'artère IVA et d'un stress pharmacologique (Sinusas 1994⁽²⁾).

Après 1 heure d'occlusion de l'artère circonflexe et 1 heure de reperfusion chez le rat, la captation à 5 minutes de la tetrafosmine est diminuée dans les zones non viables par rapport aux zones viables en dépit de débits de perfusion identiques (Takahashi 1997). D'autre part, la captation de la tetrafosmine dans un territoire ayant subi 180 minutes d'ischémie et 90 minutes de reperfusion entraînant un infarctus représentant 12 ± 3 % de la masse du ventricule gauche est inférieure à la captation du traceur dans la zone saine pour des débits de perfusion similaires (Glover 1999). Ces deux études indiquent que la captation de la tetrafosmine est affectée par la viabilité cellulaire en plus du débit de perfusion.

c. Elimination myocardique de la tetrafosmine

Sur cœur isolé et perfusé de rat, le lavage cardiaque de la tetrafosmine est inférieur à celui du thallium 201 (Takahashi 1997). D'autre part, les cinétiques de lavage du traceur suivies par détection externe ne sont pas différentes dans la zone ischémique et dans la zone saine au cours des 15 minutes suivant l'injection (Sinusas 1994⁽²⁾).

d. Redistribution de la tetrafosmine

L'étude de Takahashi et al. (1997) citée ci-dessus indique que la captation de la tetrafosmine à 1 heure dans les territoires viables et non-viables respectivement est identique à la captation du traceur à 5 minutes. Ceci indique que la tetrafosmine ne redistribue pas. Dans les mêmes

conditions, une redistribution du thallium 201, et dans une moindre mesure du Tc-Mibi, est observée.

e. Conclusion

La tetrofosmine est un complexe cationique lipophile. Il semble que ses mécanismes de captation cellulaire soient identiques à ceux du Tc-Mibi.

La fraction d'extraction myocardique du traceur est inférieure à celles du thallium 201 et du Tc-Mibi. La captation de la tetrofosmine reflète le débit de perfusion régional. Cependant, les bas débits et les hauts débits sont très nettement sur- et sous-estimés, respectivement. La tetrofosmine ne présente pas de phénomène de redistribution.

2.5 ^{99m}TcN-NOET

Le ^{99m}TcN-NOET, ou [bis(N-éthoxy, N-éthyl dithiocarbamate) nitruro technetium (V)] est un complexe neutre et lipophile (coefficient de partage octanol/eau = 3100). Il a été choisi parmi une série de complexes de la famille des dithiocarbamates pour son importante fixation dans le cœur de rat ($4,28 \pm 0,18\%$ de la dose injectée à 5 minutes), de chien et de primate (Pasqualini 1994).

a. Localisation cellulaire de ^{99m}TcN-NOET

Les études de distribution subcellulaire semblent indiquer que ^{99m}TcN-NOET est lié aux membranes cellulaires en raison de sa lipophilie (Uccelli 1992, Uccelli 1993, Uccelli 1995). Les activités cytosolique et mitochondriale en traceur sont presque nulles (Uccelli 1995). Cependant, une étude microautoradiographique sur granulocytes indique que ^{99m}TcN-NOET est localisé principalement au niveau du noyau de ces cellules (Demaimay 1997, Demaimay 1997⁽²⁾).

Les mécanismes de fixation cellulaire de ^{99m}TcN-NOET ont été étudiés *in vitro* sur un modèle de cardiomyocytes de rat nouveau-nés en culture (Riou 1998, Riou 1999). Sur ce modèle, la fixation de ^{99m}TcN-NOET n'est pas énergie-dépendante puisque la déplétion des cellules en ATP ne réduit pas la fixation du traceur après 1 minute d'incubation. L'évaluation de différentes classes d'inhibiteurs des canaux ioniques (potassiques, sodiques, calciques) a permis de mettre en évidence une interaction de ^{99m}TcN-NOET avec les canaux calciques

voltage-dépendant de type L. Ainsi le vérapamil (0,1 $\mu\text{mol/l}$) et le diltiazem (0,5 $\mu\text{mol/l}$), deux inhibiteurs des canaux calciques de type L, inhibent la fixation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ de 40%, alors que le Bay K 8644 (0,25 $\mu\text{mol/l}$), un activateur de ces même canaux, augmente la fixation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ de 70% (Figure 14). Le lien entre le $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ et les canaux calciques de type L n'est pas dû à une modification des concentrations en calcium engendrée par l'inhibition ou l'activation de ces canaux. En effet, la nifedipine, un inhibiteur des canaux calciques de type L qui se fixe à distance des canaux et qui agit de manière allostérique, ainsi que le A 23187, un ionophore du calcium, sont sans effet sur la fixation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$. Sur ce modèle de cardiomyocytes en culture, il existe donc une liaison directe de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ aux canaux calciques de type L dans leur configuration ouverte (Riou 1998, Riou 1999).

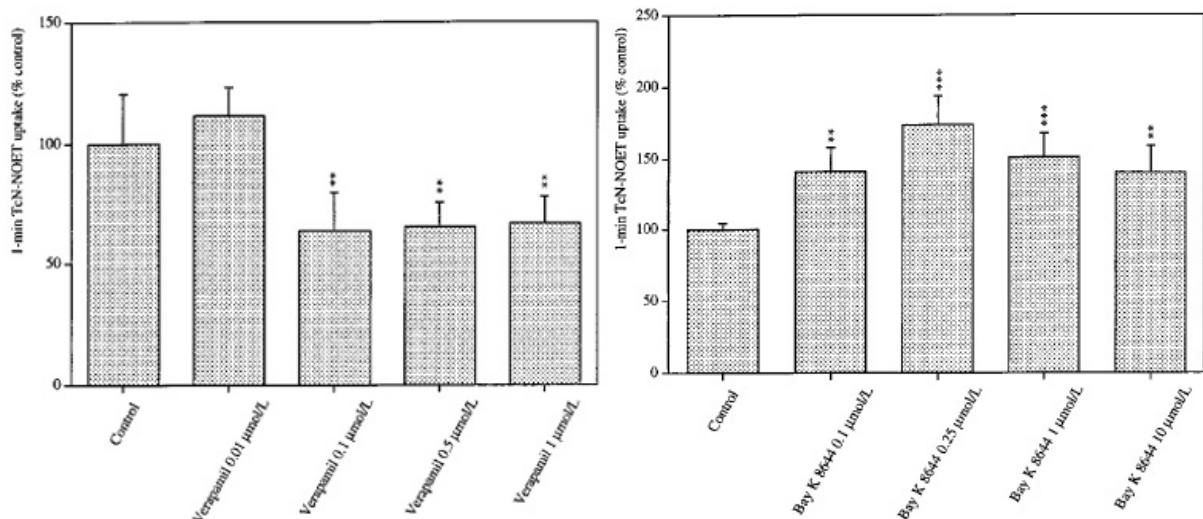


Figure 14. $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ et les canaux calciques de type L (Riou 1998).

Effet d'un inhibiteur des canaux calciques de type L, le vérapamil (à gauche) et d'un activateur de ces canaux, le BK 8644 (à droite), sur la captation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ par des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture. ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs contrôle.

En pratique clinique, les traitements par des inhibiteurs calciques aboutissent à des concentrations sanguines de ces pharmaceutiques de l'ordre de 10^{-7} mol/l (Nayler 1988). Une inhibition de la fixation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ chez ces patients est donc à envisager. Elle aurait pour conséquence une dégradation de la qualité des images scintigraphiques obtenues et rendrait difficile leur interprétation. Or, le nombre de patients susceptibles d'être traités par un inhibiteur calcique parmi les patients concernés par une scintigraphie de perfusion myocardique est important. Des études complémentaires ont donc été entreprises afin d'évaluer plus précisément ce risque d'interaction médicamenteuse.

Une première étude a été réalisée sur un modèle de cœur isolé et perfusé de rat (Riou 2000). Sur ce modèle, les trois inhibiteurs des canaux calciques de types L évalués - le vérapamil, le diltiazem et la nifedipine - sont sans effet sur la captation et sur la rétention de $^{99m}\text{TcN-NOET}$. Ces résultats pourraient s'expliquer par une localisation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ au niveau de l'endothélium vasculaire qui ne comporte pas de canaux calciques de type L. Néanmoins, des études supplémentaires, réalisées sur un modèle plus proche du cas clinique, étaient nécessaires. Réalisées dans le cadre de cette thèse, elles sont présentées dans le chapitre « travail expérimental ».

b. Captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

(a) Extraction myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Sur cœur isolé de rat, l'extraction de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ lors d'une injection en bolus représente $72,2 \pm 2,8$ % de la dose injectée. Cette valeur est diminuée lorsque le débit de perfusion contient des globules rouges avec ou sans albumine. De plus, les globules rouges préincubés avec $^{99m}\text{TcN-NOET}$ fixent le traceur et le cèdent ensuite au myocarde lors de la perfusion (Johnson 1997). Ceci suggère un mouvement bidirectionnel de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* du sang vers le myocarde et inversement.

Sur cœur isolé et perfusé de lapin, la fraction d'extraction de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est de 59 ± 6 %. Après un période d'ischémie de 10 minutes reperfusée ne provoquant pas de nécrose myocardique, la fraction d'extraction n'est pas modifiée (58 ± 3 %). En revanche, après une période d'ischémie de 45 minutes reperfusée provoquant une nécrose myocardique significative, la fraction d'extraction est significativement diminuée (42 ± 5 %). Les auteurs en concluent que $^{99m}\text{TcN-NOET}$ pourrait être utilisé comme traceur de la viabilité myocardique (Holly 1999). Cependant les études cellulaires réalisées par Riou et al. indiquent qu'*in vitro* la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est pas dépendante de la viabilité cellulaire (Riou 1998). De plus, selon Vanzetto et al. l'extraction myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* chez le chien durant la phase aiguë de reperfusion d'un territoire ischémique n'est pas dépendante de la viabilité myocardique mais du débit de reperfusion (Vanzetto 2000⁽²⁾). Les résultats obtenus par Holly et al. semblent être difficilement conciliables avec ces résultats. Une explication potentielle pourrait être que la diminution de l'extraction myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ observée *ex vivo* par Holly et al. soit due à une diminution du débit coronaire suite à la

reperfusion en raison du phénomène de non-reperfusion selon lequel un territoire infarci est souvent reperfusé de manière incomplète (Kloner 1974, Reffelmann 2003).

La fraction d'extraction de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez le chien est de $75,5 \pm 4,5 \%$ en conditions basales. Elle augmente en hyperémie pour atteindre $85 \pm 2 \%$ (Ghezzi 1995). $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est le seul traceur avec la teboroxime présentant une augmentation de la fraction d'extraction lorsque le débit de perfusion augmente.

(b) Débit de perfusion myocardique régional et fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Sur un modèle d'occlusion de l'artère IVA chez le chien associée à une infusion de dipyridamole triplant le débit dans les zones non-ischémiques, il existe une corrélation ($r = 0,94$) entre la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ à 15 minutes et le débit de perfusion (Figure 15) (Ghezzi 1995).

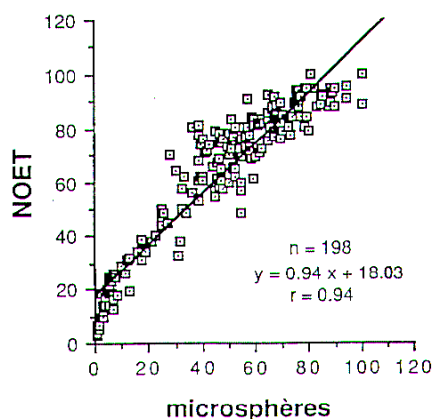


Figure 15. Corrélation entre l'activité myocardique en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (en % de l'activité maximale) et le débit sanguin coronaire régional (en % du débit maximal) 15 minutes après l'injection lors d'un stress induit par le dipyridamole (Ghezzi 1995).

Cette relation linéaire est retrouvée dans un modèle de sténose de l'artère circonflexe entraînant une diminution du débit de repos sans stress pharmacologique associé (Johnson 1997⁽²⁾). La fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sous-estime les hauts débits et sur-estime les bas débits de perfusion (Ghezzi 1995). La pente de la droite de régression linéaire corrélant le débit à la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est proche de celle de la droite d'identité dans ces deux études, pour des méthodes de normalisation des activités en traceur et des débits différentes.

Lors d'un stress pharmacologique induit par la dobutamine ou par l'adénosine, la relation entre la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et le débit est identique à celle du ^{201}Tl (Calnon 1999). La même équipe a par ailleurs montré que la tetrofosmine et le Tc-Mibi apprécient moins bien

que le ^{201}Tl cette hétérogénéité de la perfusion sous adénosine, et que la dobutamine altère la fixation myocardique du Tc-Mibi (Figure 16) (Calnon 1999).

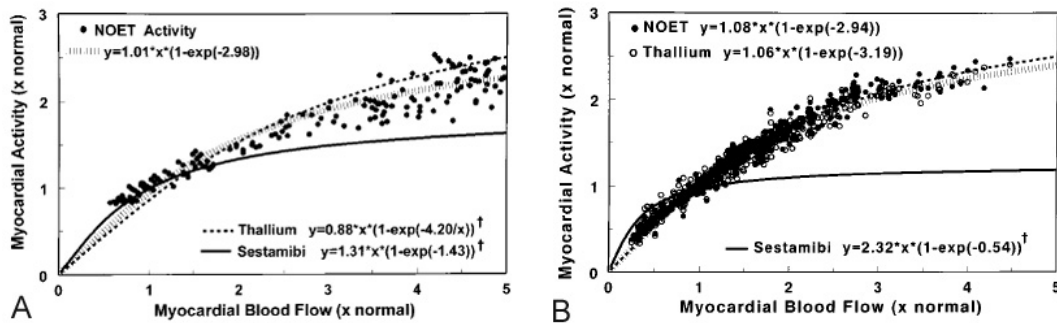


Figure 16. Relation entre le débit de perfusion régional et l'activité myocardique en $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$, en ^{201}Tl et en Tc-MIBI après sténose de l'artère IVA et lors d'un stress pharmacologique induit par l'adénosine (A) ou par la dobutamine (B) (Glover 1999).

$^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ a également été évalué chez le chien pour la détermination de la réserve coronaire après une période d'ischémie de 60 minutes suivie d'une reperfusion du territoire ischémique à travers une sténose critique. La taille de l'infarctus est similaire dans les deux groupes d'animaux ($9 \pm 2\%$ et $8 \pm 2\%$ du ventricule gauche). $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ est injecté 165 minutes après la levée de l'occlusion en présence d'un stress pharmacologique. Dans ces conditions, la captation du traceur permet de mettre en évidence la présence d'une sténose critique. En effet, le rapport d'activité en traceur entre la zone précédemment ischémique et la zone saine est de $0,67 \pm 0,02$ en présence de la sténose résiduelle, et de $0,80 \pm 0,01$ en son absence 60 minutes après son injection. De plus, cette dernière valeur souligne l'altération de la réserve coronaire chez les animaux du groupe contrôle chez lesquels l'occlusion est entièrement levée (Takehana 2001).

Enfin, dans le contexte d'un infarctus aigu reperfusé chez le chien, la fixation de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ 5 et 120 minutes après la reperfusion reflète le débit de reperfusion plus que la viabilité du territoire reperfusé lorsque le traceur est injecté immédiatement après la levée de l'occlusion (Vanzetto 2000⁽²⁾).

c. Elimination myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Lorsque le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est injecté *in vivo* chez le chien, il reste à une heure $43,5 \pm 2,0$ % de l'activité à 5 minutes (Ghezzi 1995).

Sur cœur isolé de rat après une injection en bolus, le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est quasiment pas relargué du myocarde après 60 minutes de lavage avec du liquide de Krebs-Henseleit non supplémenté (Johnson 1996, Johnson 1997). En revanche, le lavage myocardique est accéléré lorsque le liquide de perfusion est supplémenté avec des globules rouges, et ce phénomène est accentué par une perfusion avec des globules rouges et de l'albumine (Johnson 1997). Une étude récente indique que la présence dans le liquide de perfusion d'albumine est suffisante pour accélérer le lavage myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, et que cette augmentation est plus importante lorsque des lipides sont liés à l'albumine (Riou 2003). L'ensemble de ces résultats confirme l'interaction entre $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et les éléments sanguins décrite ci-dessus. La perfusion avec un détergent, le Triton X-100 0,5 %, accélère également le lavage du traceur, suggérant une liaison de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ aux membranes cellulaires de l'endothélium vasculaire (Johnson 1996).

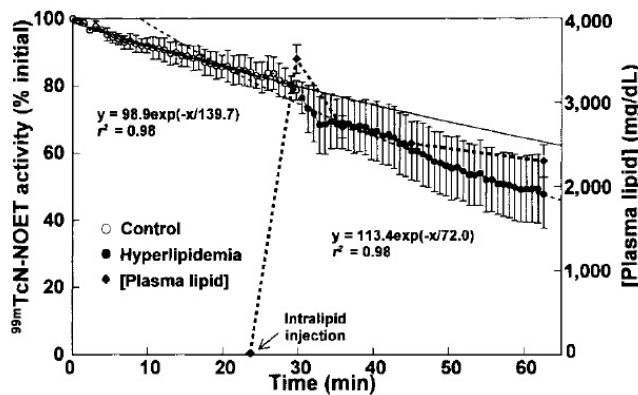


Figure 17. *In vivo* chez le chien, le lavage myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est accéléré par l'injection intraveineuse de lipides (Riou 2003).

Ce mouvement bidirectionnel de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre le sang et le myocarde a également été mis en évidence *in vivo* chez le chien. Sur ce modèle, le lavage de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est augmenté par l'infusion intraveineuse de lipides ($t_{1/2} = 51,8 \pm 11,8$ min vs $108,0 \pm 23,9$ min) ainsi que par une élévation du débit sanguin myocardique de 4,9 fois ($40,7 \pm 7,3$ min vs $t_{1/2} = 81,1 \pm 12,1$) (Figure 17) (Riou 2003).

d. Redistribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Le phénomène de redistribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ a été mis en évidence :

- sur des modèles d'ischémie-reperfusion.
- sur des modèles d'ischémie permanente.

(a) Modèles d'ischémie-reperfusion

Lorsque $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est injecté sous dipyridamole en présence d'une sténose de l'artère IVA et que l'occlusion est levée 10 minutes après l'injection du traceur, la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est plus corrélée au débit après 80 minutes de reperfusion. Dans les mêmes conditions, la captation du Tc-Mibi est toujours corrélée au débit sanguin coronaire (Ghezzi 1995). Ce phénomène de redistribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est retrouvé par Vanzetto et al. (1997) 2 heures après la levée de l'occlusion : le rapport des concentrations en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la zone ischémique par rapport à la zone saine reflète alors le rapport des débits après la reperfusion. Ce phénomène s'explique par un lavage plus lent du traceur dans la zone précédemment ischémique par rapport à la zone saine (Figure 18).

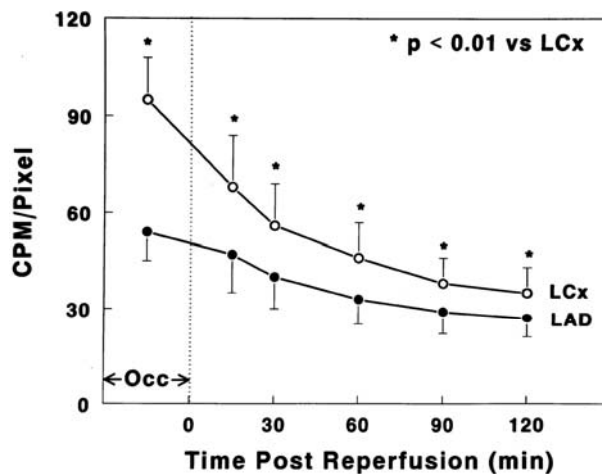


Figure 18. Cinétiques de lavage cardiaque de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la zone normale (LCx) et dans la zone précédemment ischémique (LAD = IVA). Le traceur est injecté sous sténose de l'artère IVA (Vanzetto 1997).

b) Modèles d'ischémie permanente

15 et 90 minutes après l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ en présence d'une sténose coronaire, la fixation du traceur est corrélée au débit sanguin coronaire, mais la pente de la droite de régression linéaire diminue au cours du temps. Ce résultat suggère l'existence d'un phénomène de redistribution du traceur sans levée de l'occlusion (Ghezzi 1995). Ceci a été confirmé par la suite. En effet, lorsque le débit est diminué de manière permanente, la fixation relative de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la zone ischémique 150 minutes après l'injection est significativement supérieure ($p < 0,01$) à celle observée après 20 minutes (Figure 19). La fixation du traceur dans la zone non-ischémique diminue dans ces mêmes conditions (Ghezzi 1996). Ces variations sont similaires à celles observées pour le thallium 201.

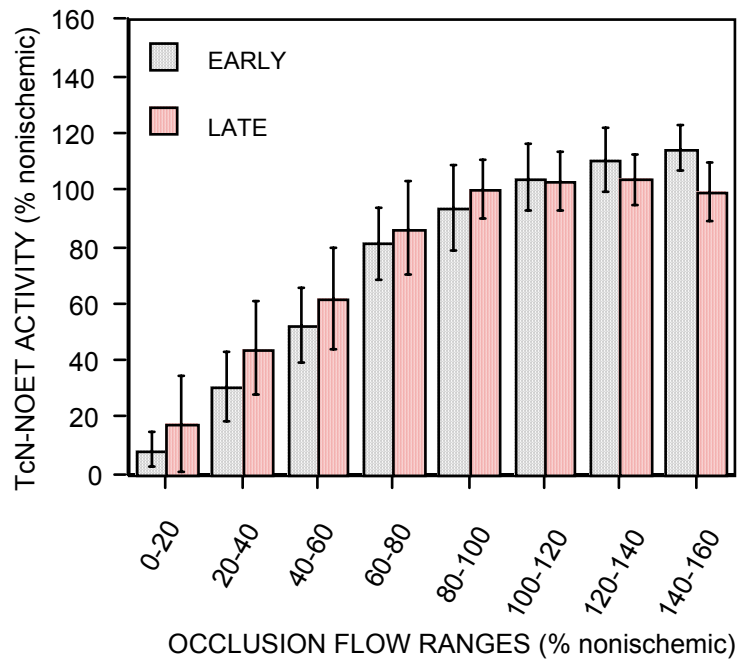


Figure 19. Activités myocardiques précoce (20 min) et tardive (150 min) de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ exprimées en % de la zone non-ischémique. Les activités sont représentées en fonction des intervalles de débits pendant l'occlusion (Ghezzi 1996).

Cette redistribution sans levée de l'occlusion est retrouvée par Vanzetto et al. (1997) 120 minutes après l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$. Le comportement du thallium 201 est également identique dans ces conditions. En ce qui concerne le $^{99m}\text{TcN-NOET}$, la redistribution s'explique également par une cinétique de lavage plus lente dans la zone ischémique par rapport à la zone saine (Figure 20). L'étude de Johnson et al. (1997⁽²⁾) confirme cette

redistribution ainsi que le mécanisme impliqué. La redistribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est détectable en imagerie. Elle a également été étudiée sur un modèle d'occlusion critique de l'IVA réalisée chez le chien, caractérisé par un débit de l'IVA normal à l'état basal mais qui ne s'élève pas lors du stress pharmacologique à l'adénosine. Sur ce modèle, le rapport de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre la région de l'artère IVA et la région de l'artère circonflexe indique que la redistribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est rapide durant les 10 premières minutes suivant son injection et qu'elle est quasiment complète après 120 minutes. En conséquence, lors d'un examen de stress-redistribution, les images initiales doivent être acquises durant les 10 premières minutes suivant l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et les images de redistribution 2 heures après. Un protocole d'imagerie en stress-redistribution réalisé avec le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ serait donc significativement plus court qu'avec le ^{201}Tl (Petruzella 2000).

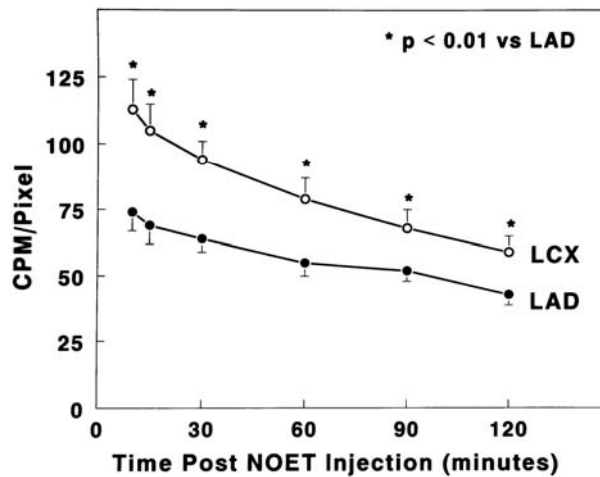


Figure 20. Cinétiques de lavage cardiaque de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la zone normale et dans la zone ischémique après injection intraveineuse lors d'une sténose permanente de l'artère IVA (Vanzetto 1997).

e. Conclusion

Les mécanismes de captation cellulaire de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ semblent indiquer une localisation du traceur au niveau de l'endothélium vasculaire. La fraction d'extraction du traceur est légèrement inférieure à celle du thallium 201 au repos, et similaire lorsque le débit de perfusion est augmenté. La corrélation entre la fixation myocardique régionale du traceur et le débit est comparable à celle du thallium 201. Enfin, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ présente un phénomène de redistribution identique à celui du thallium 201.

3. Conclusion

La réalisation de scintigraphies myocardiques en imagerie SPECT est la technique utilisée quotidiennement en clinique pour diagnostiquer l'ischémie myocardique.

Le thallium 201 est actuellement le traceur radioactif du débit sanguin coronaire le plus utilisé. Sa fraction d'extraction (82 à 88%) est élevée. Il apprécie la perfusion myocardique sur une large gamme de débits, avec une légère sous- et sur-estimation des hauts- et bas-débits, respectivement. Son phénomène de redistribution est utilisé en pratique clinique pour apprécier la viabilité d'un territoire hypoperfusé. Malgré des caractéristiques physiques moins favorable que le technétium-99m, il reste le traceur de référence auquel est comparé tout nouveau complexe technétié proposé.

Ainsi, sur un plan expérimental, par rapport au thallium 201 :

- Le Tc-Mibi présente une fraction d'extraction plus faible ($68,3 \pm 4,7\%$). Sa captation dans les territoires à hauts et bas débits est moins bien corrélée au débit de perfusion que celle du thallium 201. Le phénomène de redistribution observé est trop modeste pour pouvoir envisager une application clinique.
- La fraction d'extraction de la teboroxime ($88 \pm 5\%$) est similaire à celle du thallium 201. Pour les temps très précoces après l'injection, ce traceur apprécie mieux que le thallium 201 l'hétérogénéité de la perfusion. Cependant, cet avantage s'estompe rapidement en raison de la cinétique d'élimination myocardique très rapide du traceur. La teboroxime présente un phénomène de redistribution dû à des cinétiques de lavage différentes dans les zones ischémiques et normales. Ce phénomène est cependant trop rapide pour être exploitable. La commercialisation de la teboroxime est interrompue.
- La tetrofosmine présente une fraction d'extraction faible ($54,0 \pm 3,7\%$). Les sous- et sur-estimations des hauts- et bas-débits sont plus marquées que celles du thallium 201. Le traceur ne redistribue pas.
- La fraction d'extraction de TcN-NOET ($75,5 \pm 4,5\%$) est supérieure à celles du Tc-Mibi et de la tetrofosmine. Elle est légèrement inférieure à celle du thallium 201 en conditions basales. En hyperémie, les fractions d'extraction des 2 traceurs sont similaires. Les bas et hauts débits sont respectivement sur- et sous-estimés par la fixation du traceur, mais TcN-NOET apprécie mieux que le thallium 201 l'hétérogénéité de la perfusion lors d'un stress

pharmacologique induit par l'adénosine. Ceci lui confère un avantage théorique pour l'appréciation de la réserve coronaire. Une redistribution macroscopiquement identique à celle du thallium 201 est observée avec TcN-NOET.

Sur un plan expérimental, TcN-NOET est donc le premier complexe technétié présentant un comportement identique sinon meilleur que celui du thallium 201 (Tableau 1).

Traceur	Emission	Caract. chimiques	Mécanismes de captation	F.E. (%)	Redistribution
Thallium 201	88% X (69 à 83 keV)	Cation hydrophile	Na/K ATPase	88	Oui
Tc-Mibi	γ pur 140 keV	Cation lipophile	Em et $\Delta\Psi$	68	Modérée
Teboroxime	γ pur 140 keV	Neutre lipophile	Répartition membranaire	88	Oui
TcN-NOET	γ pur 140 keV	Neutre lipophile	Membranaire Aspécifique ?	75	Oui

Tableau 1. Principales caractéristiques chimiques et biologiques des traceurs radioactifs de la perfusion myocardique proposés à ce jour en imagerie SPECT.

B. Les traceurs utilisables en imagerie TEP

L'imagerie SPECT constitue l'unique modalité d'imagerie utilisée en pratique clinique pour l'étude du débit de perfusion myocardique. Néanmoins des traceurs utilisables en imagerie tomographique par émission de positons (TEP) sont également en cours de développement. Cette modalité d'imagerie offre la possibilité de quantifier la perfusion myocardique de manière absolue (ml/min/g). Cette quantification n'est pas réalisable en SPECT, principalement du fait de l'atténuation de l'émission avec la profondeur de tissu traversé.

1. Intérêt

La quantification en PET des débits de perfusion myocardique de manière absolue pourrait être un outil pertinent dans le cas où la perfusion du myocarde est anormale mais relativement homogène. C'est le cas dans certaines pathologies telles que les cardiomyopathies, les atteintes tri-tronculaires ou lors de transplantations cardiaques. Ces situations peuvent entraîner une sous-estimation du territoire ischémique en imagerie SPECT (Christian 1992). Cependant Lima et al. ont démontré que la détection des atteintes tritronculaires en SPECT à l'aide du Tc-MIBI pouvait être améliorée par le couplage de l'information de perfusion avec l'information de fonction cardiaque. Cette information de fonction cardiaque est déduite de l'effet de volume partiel selon lequel le rapport d'activité d'un voxel entre la diastole et la systole est fonction de la contraction du myocarde. Comparativement au diagnostic fourni par l'unique information de perfusion, le couplage perfusion/fonction permet de détecter un plus grand nombre de segments anormaux par patient ($6,2 \pm 4,7$ vs $4,1 \pm 2,8$; $P < 0,001$). La valeur prédictive de l'imagerie SPECT peut donc être améliorée pour la détection d'une diminution globale de la perfusion (Lima 2003).

2. Principe

Toutes les approches quantitatives nécessitent l'utilisation d'un modèle mathématique compartimental. Ceci implique une bonne connaissance du comportement du traceur et de ses mécanismes de transfert du sang vers le myocarde. Des régions d'intérêt (ROI) sont placées au niveau du sang et du myocarde et les deux cinétiques obtenues permettent de calculer les débits sanguins à l'aide du modèle mathématique. Le calcul inclut les corrections de l'effet de

volume partiel (modification de l'activité d'un voxel en fonction de la contraction du myocarde lors du cycle cardiaque) et de décroissance radioactive.

3. Les traceurs

Les 3 principaux traceurs évalués pour l'évaluation de la perfusion en imagerie PET sont le chlorure de rubidium-82 (^{82}Rb), l'ammoniac marqué à l'azote-13 (^{13}N) et l'eau marquée à l'oxygène 15 (^{15}O). Les synthèses du ^{13}N et de l' ^{15}O nécessitent la proximité d'un cyclotron (demi-vies de 10 et 2,1 min respectivement). En raison de ces demi-vies très courtes, leur utilisation est principalement limitée aux centres situés à proximité direct du site de production et reste le plus souvent limitée au domaine de la recherche. Le rubidium-82 en revanche, bien que possédant également une demi-vie très courte (1,3 min), est produit par générateur, ce qui le rend plus largement accessible. Il a été démontré que ces 3 traceurs permettent de mettre en évidence des ischémies myocardiques lorsque la sténose est supérieure à 40 % (Tableau 2).

Isotope	Demie-vie physique	Composé	Comportement
<i>Produit par un générateur</i>			
^{82}Rb (parent : ^{82}Sr)	1,3 min (26 jours)	Chlorure	Extraction
<i>Produit par un cyclotron</i>			
^{15}O	2,1 min	Eau	Diffusion
^{13}N	10 min	Ammoniac	Extraction

Tableau 2. Les traceurs de la perfusion en TEP (Beller 2004).

3.1 ^{82}Rb

Le ^{82}Rb est un traceur extractible. Considéré comme un analogue du potassium, sa captation myocardique reflète un transport cationique actif. Sa demi-vie est de 76 secondes mais il présente l'avantage de pouvoir être obtenu par un générateur de strontium (demi-vie : 26 jours). Le plateau de captation de ce traceur est obtenu pour des débits excédant 2 à 3 ml/min/g.

Une perfusion intraveineuse de 30 à 60 mCi de ^{82}Rb issu du générateur est réalisée et les images sont acquises après un délai de 3 à 7 minutes. La captation du ^{82}Rb est quantifiée à l'aide d'un modèle mathématique à deux compartiments (Mullani 1983, Goldstein 1983). Une bonne corrélation a été observée entre la captation de ^{82}Rb et le débit sanguin myocardique régional. Ainsi, une étude réalisée chez le chien indique qu'il existe une excellente corrélation entre la captation de ce traceur et le débit sanguin myocardique régional déterminé par la technique des microsphères radioactives ($r = 0,97$ pour des débits compris entre 0,02 et 7,76 ml/min/g) (Figure 21) (Goldstein 1983).

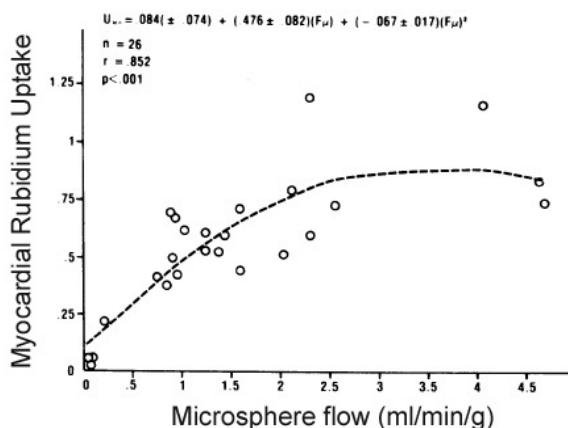


Figure 21. Corrélation de la fixation du Rubidium-82 au débits sanguins myocardiques déterminés par la technique des microsphères radioactives (Goldstein 1983).

Des études expérimentales ont montré qu'une période d'ischémie-reperfusion entraîne une diminution de la captation du rubidium. Cette diminution n'est pas liée à une diminution du débit mais à une diminution du transport cellulaire (Fukuyama 1978). Ce phénomène s'observe même pour de courtes périodes d'ischémie reperfusée *in vivo* chez le chien (Wilson 1987). Le ^{82}Rb a été largement étudié chez l'homme pour l'évaluation de la perfusion dans le myocarde ischémique (Gould 1986, Goldstein 1986, Williams 1994). Une étude réalisée par Goldstein et al. (1986) indique que le ^{82}Rb permet de diagnostiquer chez l'homme la présence d'infarctus du myocarde. De plus, le ^{82}Rb permet de diagnostiquer les patients présentant une sténose responsable d'une réserve de débit sanguin coronaire < 3 ($n = 50$) avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 100 % (Gould 1986). Selon une analyse rétrospective réalisée chez 1460 patients, le ^{82}Rb permet de diagnostiquer les sténoses supérieures à 67 % du diamètre artériel avec une sensibilité de 87 % et une spécificité de 88 % (Williams 1994). L'utilisation du ^{82}Rb a été validée par la « Food and Drug Administration » (FDA).

Récemment, Parkash et al. ont étudié l'apport de la quantification des débits sanguins myocardiques régionaux à l'aide du ^{82}Rb chez des patients présentant des sténoses importantes au niveau des trois artères coronaires. Chez ces patients, les débits sanguins myocardiques régionaux sont diminués à l'effort dans la quasi-totalité du myocarde et la perfusion est donc relativement homogène. La quantification des débits à l'aide du ^{82}Rb permet donc de ne pas sous-estimer l'étendue du défaut de perfusion chez ces patients (Figure 22).

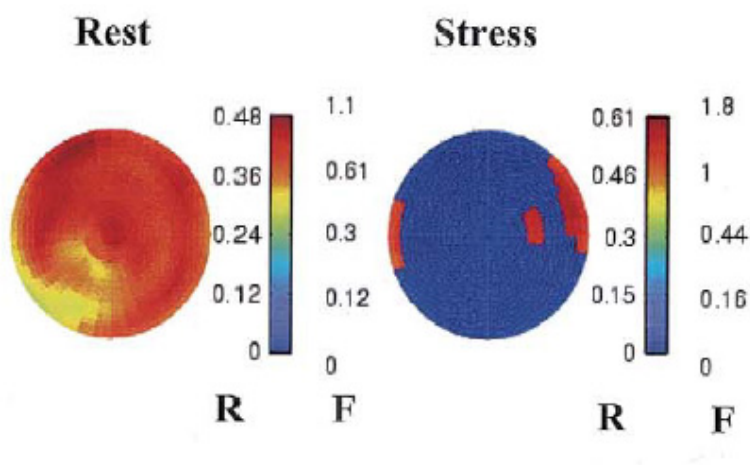


Figure 22. Quantification des débits de perfusion myocardique régionaux avec le ^{82}Rb (Parkash 2004).

Chez un patient présentant des sténoses importantes au niveau des trois artères coronaires, la perfusion est relativement homogène au repos (à gauche) mais également durant un stress pharmacologique (à droite). Cependant, la quantification des débits (F) indique qu'il existe une importante diminution de la réserve coronaire dans la quasi-totalité du myocarde (90% du territoire de l'artère coronaire interventriculaire, 64% du territoire de l'artère circonflexe et 100 % du territoire de l'artère coronaire droite)

3.2 ^{13}N -Ammoniac

L'ammoniac marqué au ^{13}N est un traceur extractible. Son mécanisme de captation est encore mal connu. La captation et la rétention du ^{13}N -ammoniac sont dépendantes du métabolisme puisque le ^{13}N -ammoniac peut être converti en glutamine. Il existe une relation inverse et non-linéaire entre la fraction d'extraction du ^{13}N -ammoniac et le débit. Le plateau de captation est obtenu pour des débits excédant 2 ml/min/g (Shah 1985).

Une injection intraveineuse de 10 à 15 mCi d'ammoniac marqué au ^{13}N est réalisée et les images sont acquises après un délai de 5 à 10 minutes. Une bonne corrélation a été observée

entre la captation du traceur et le débit de perfusion myocardique (Bergman 1998). Différents modèles mathématiques ont été proposés pour la quantification (Shah 1985, Hutchins 1990), cependant ils ne sont pas entièrement satisfaisants puisque les débits sont sous-estimés et représentent 70 à 80 % de ceux obtenus avec le ^{82}Rb ou l'eau marquée à l' ^{15}O (Sciaccia 2001).

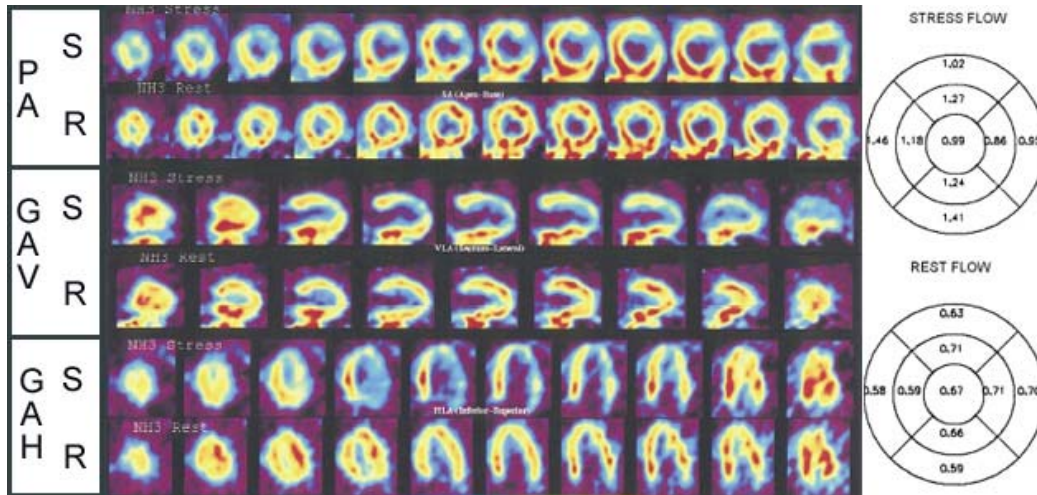


Figure 23. Images petit-axe (PA) et grand-axe verticales (GAV) et horizontales (GAH) de la perfusion myocardique obtenues avec le $^{13}\text{NH}_3$ lors d'un stress pharmacologique induit par l'adénosine (S) et au repos (R). Un important territoire ischemique est visible dans la région antéro-apicale et latérale lors du stress. A droite, sur les images en coordonnées polaires, l'analyse quantitative des débits (ml/min/g) confirme l'homogénéité des débits au repos et la diminution antéro-apicale et latérale du débit lors du stress pharmacologique ($< 2,5 \times$ le débit au repos) (Beller 2004).

Malgré une captation du ^{13}N -ammoniac par les poumons et le foie, ce traceur permet de réaliser des images de la perfusion myocardique avec une bonne qualité (Figure 23). Ce traceur a été largement utilisé pour l'évaluation de la perfusion myocardique en TEP. (Hutchins 1990, Schelbert 1982). La quantification des débits par l'ammoniac marqué au ^{13}N a été utilisée avec succès pour l'évaluation des altérations de la réserve de débit et de la fonction endothéliale vasculaire chez des sujets asymptomatiques possédant des antécédents familiaux associés à une élévation des taux plasmatiques de cholestérol et de LDL. Pour ce groupe de patient, la réserve de débit coronaire vaut $2,93 \pm 0,86$ contre $4,27 \pm 0,52$ chez les patients du groupe contrôle ($P < 0,001$) (Dayanikli 1994).

3.3 ^{15}O -Eau

L' H_2^{15}O est le seul traceur diffusible permettant d'évaluer la perfusion myocardique en TEP. C'est un traceur pur du débit sanguin coronaire.

Une injection intraveineuse de 15 à 25 mCi d' H_2^{15}O est réalisée et les images sont acquises après un délai de 5 minutes. Une étude réalisée chez le chien indique qu'il existe une excellente corrélation entre la captation de ce traceur et le débit sanguin myocardique régional déterminé par la technique des microsphères radioactives ($r = 0,95$ pour des débits compris entre 0,29 et 5,04 ml/min/g) (Bergmann 1989). La localisation du traceur dans le compartiment sanguin nécessite une correction des images obtenues. Elle peut être réalisée par la soustraction aux images d' H_2^{15}O , soit d'images obtenues séparément avec du monoxyde de carbone marqué à ^{15}O qui marque les globules rouges, soit d'images obtenues durant les 20 à 40 premières secondes suivant l'injection lorsque le traceur n'a pas encore diffusé dans le myocarde (Bergman 1989).

Des études indiquent que la quantification des débits peut être réalisée chez l'homme à l'aide de H_2^{15}O (Walsh 1990, Bergmann 1998). De plus, la quantification des débits a également été réalisée chez des patients souffrant d'angine de poitrine et présentant une angiographie normale. Chez ces patients, les défauts de perfusion et de réserve de débit sanguin coronaire, homogènes dans l'ensemble du myocarde, sont détectés sur la base de la quantification des débits de perfusion au repos et lors d'un stress pharmacologique au dypiridamole (Geltman 1990). Il a également été suggéré que l'eau marquée à ^{15}O pouvait être utilisée pour l'évaluation de la viabilité myocardique sur la base d'un index de perfusion tissulaire (Yamamoto 1992). Plus récemment, Yoshinaga et al. (2003) ont montré qu'une diminution de la réserve coronaire dans des régions de sténoses sans anomalie de perfusion au MIBI pouvait être mise en évidence avec l'eau marquée à ^{15}O .

IV. Conclusion

En pratique clinique, le thallium-201 reste le traceur de référence pour l'évaluation de la perfusion myocardique. L'inconvénient principal du thallium 201 est la dosimétrie élevée délivrée au patient lors d'un examen. Les complexes technétiés permettent de s'affranchir de ce problème. Cependant :

- Le Tc-Mibi et la teboroxime ne présentent pas le même comportement que le thallium 201 (absence de redistribution).
- La commercialisation de la teboroxime est interrompue en raison de ses cinétiques myocardiques trop rapides.
- Bien qu'il existe certaines indications cliniques pour lesquelles la quantification de la perfusion myocardique serait pertinente, la quantification des débits de perfusion par l'utilisation des traceurs TEP reste actuellement un outil de recherche. Cependant, la mise en place de caméras TEP dans l'ensemble des services de médecine nucléaire des pays industrialisés pour la réalisation des examens au ^{18}F FDG en cancérologie permet d'envisager une utilisation du rubidium-82 dans les prochaines années puisque celui-ci peut à présent être délivré par un générateur de longue durée de vie ($T_{1/2} = 26$ jours).

Il existe donc une place pour TcN-NOET, premier complexe technétié se comportant comme le thallium 201. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser ce traceur.

Le travail présenté ici comporte deux objectifs :

- Etudier *in vivo* chez le chien l'effet du vérapamil, un inhibiteur calcique, sur la fixation myocardique de $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$.
- Etudier la relation entre le $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ et la viabilité myocardique *in vivo* sur un modèle chronique d'ischémie myocardique chez le rat.

Partie I :

Travail expérimental

Etude *in vivo* de la fixation de
 $^{99}\text{TcN-NOET}$, un traceur de la perfusion
myocardique.

- *Effet du vérapamil-*

- *relation avec la viabilité myocardique-*

I. Etude de l'effet du vérapamil sur la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* sur un modèle expérimental d'ischémie myocardique chez le chien.

A. Introduction

Le Thallium-201 (^{201}Tl) permet de réaliser l'imagerie de la perfusion myocardique. Ce traceur est largement utilisé pour établir le diagnostic et le pronostic de pathologies coronaires avérées ou suspectées. Le Bis (N-éthoxy, N-éthyl dithiocarbamate) nitrure technétium (V) [^{99m}Tc] ($^{99m}\text{TcN-NOET}$) est un nouveau traceur pour l'imagerie de perfusion myocardique. Ce traceur bénéficie par rapport au ^{201}Tl des bonnes caractéristiques physiques offertes par le technétium-99m (Pasqualini 1994). La corrélation entre la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et les débits sanguins myocardiques régionaux a été évaluée chez le chien sur des modèles associant une occlusion coronaire, afin d'obtenir un territoire myocardique avec des débits faibles, à un stress pharmacologique, afin d'obtenir des territoires myocardiques avec des débits élevés. Ces modèles d'étude ont permis de mettre en évidence que, de manière identique à celle du ^{201}Tl , la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est corrélée avec le débit sanguin myocardique régional sur une large gamme de débits (Ghezzi 1995, Calnon 1999). Un phénomène de redistribution du $^{99m}\text{TcN-NOET}$ a également été mis en évidence sur des modèles d'ischémie myocardique transitoire ou permanente (Ghezzi 1995, Vanzetto 2000). Cependant, contrairement à celle du ^{201}Tl , la captation myocardique du $^{99m}\text{TcN-NOET}$ reflète le débit de reperfusion et non la viabilité lorsque le traceur est injecté à la phase aigue de la reperfusion sur un modèle expérimental d'infarctus du myocarde reperfusé chez le chien (Vanzetto 2000⁽²⁾). D'un point de vue clinique, aucune différence significative n'a été trouvée entre le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et le ^{201}Tl en termes de sensibilité et de spécificité dans la détection des sténoses coronaires excédant 50 ou 70% (Fagret 1995). Le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ a fait l'objet d'études cliniques de phase III aux Etats-Unis et en Europe.

Des études réalisées *in vitro* sur cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture primaire montrent que la captation cellulaire de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est liée aux mouvements calciques. En effet, des inhibiteurs des canaux calciques tels que le vérapamil et le diltiazem diminuent significativement la fixation du traceur de 40 % (Riou 1998). En revanche, les inhibiteurs des

canaux calciques sont sans effet sur la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sur un modèle de cœur isolé et perfusé de rat (Riou 2000).

Des difficultés à transposer *in vivo* les mécanismes de captation cellulaire déterminés *in vitro* ont également été décrites pour le ^{201}Tl (Piwnica-worms 1990, McCall 1985). En effet, bien que l'effet inhibiteur de la ouabaïne ait été mis en évidence sur la captation *in vitro* du ^{201}Tl (McCall 1985), des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'effet de cette drogue *ex vivo* (Meerdink 1989, McGoron 1996) ou *in vivo* (Melin 1986, Brismar 1991). En revanche, concernant le $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, il a été observé que la dobutamine induit une diminution de la captation myocardique de ce traceur chez le chien en diminuant le potentiel de membrane mitochondrial (Calnon 1997, Calnon 1997⁽²⁾), ce qui semble indiquer que les mécanismes de captation cellulaire déterminés *in vitro* par Piwnica-Worms et al. (1990) pourraient être transposés *in vivo* chez le chien.

Les antagonistes des canaux calciques sont fréquemment prescrits aux patients susceptibles d'être concernés par un examen d'imagerie de perfusion myocardique. En conséquence, cette étude a été entreprise afin de déterminer si l'effet inhibiteur des antagonistes des canaux calciques sur la captation cellulaire de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ observé *in vitro* (Riou 1998) pouvait être reproduit *in vivo* chez le chien.

Afin d'en faciliter la compréhension, l'étude est présentée ici dans son ensemble, cependant, le premier des deux protocoles mis en œuvre (groupe 1) a été réalisé par Laurent Riou au cours de sa thèse au sein du Laboratoire d'Etude des Radiopharmaceutiques (Riou 1999).

B. Matériel et méthode

1. Préparation des radiotraceurs

1.1 $^{99m}\text{TcN-NOET}$:

$^{99m}\text{TcN-NOET}$ est préparé à partir d'un kit fourni par CIS bio International – Schering S.A (Gif-sur-Yvette, France).

Flacon A :

Composés	Quantité
$\text{SnCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 mg
Acide 1, 2-diaminopropane-N, N, N', N'-tétraacétique	5,0 mg
Succinyl dihydrazide	5,0 mg
Phosphate de sodium dihydrogéné	0,5 mg
Monohydrogène de phosphate disodique	5,8 mg

Flacon B :

Composés	Quantité
N-éthoxy, N-éthyl dithiocarbamate de sodium (NOET)	12 mg
2,6-diméthyl- β -cyclodextrine	12 mg
H_2O	qsp 1,2 ml

Le technétium-99m (^{99m}Tc) provient d'un générateur Elumatic III (Service de Médecine Nucléaire, CHU de Grenoble), permettant d'obtenir une solution stérile et apyrogène de ^{99m}Tc sous forme de pertechnétate de sodium. 740 MBq (20 mCi) de ce technétium 99m sont injectés dans le flacon A. Après 30 minutes à température ambiante, la réduction de l'ion TcO_4^- du degré d'oxydation +VII à +V s'effectue et le cœur $[\text{TcN}]^{2+}$ est formé :



L'adjonction du flacon B au flacon A donne à l'issue d'une incubation de 30 minutes le complexe technétié final :

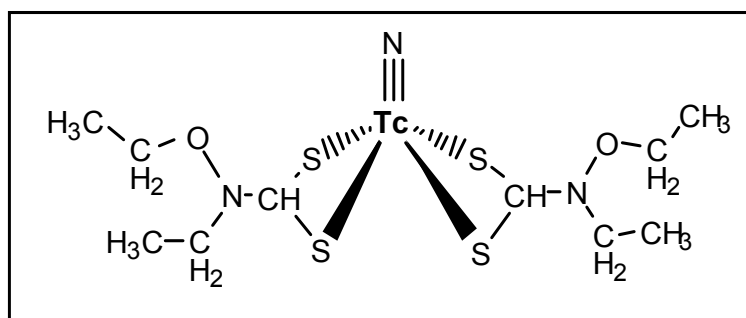
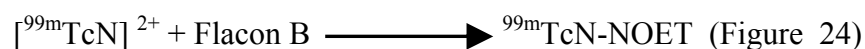


Figure 24. Formule développée de TcN-NOET.

Une chromatographie en couche mince (CCM) sur silice est réalisée afin de vérifier la pureté radiochimique (> 95%) (Analyseur Berthold). L'acétate d'éthyle est utilisé comme solvant.

1.2 ^{201}Tl

Le ^{201}Tl est fourni par CIS bio International – Schering S.A.

2. Animaux utilisés

17 chiens adultes d'un poids moyen de $22,5 \pm 1,3$ kg (poids moyen \pm SEM) sont utilisés pour cette étude.

3. Anesthésie

Les animaux sont pré-médiqués avec de la kétamine (10 mg/kg), anesthésiés avec du Thiopental (20 mg/kg en bolus suivi d'une perfusion à 10 mg/kg/h) et ventilés à l'air ambiant à l'aide d'un respirateur (LKB Medical LB, Sweden).

4. Chirurgie

La veine fémorale gauche est canulée à l'aide d'un cathéter 8 Frensch (8F) en polyéthylène pour l'administration des fluides et des traceurs. Les deux artères fémorales sont également isolées et canulées à l'aide de cathéters 8F en polyéthylène. L'une permet le suivi de la pression artérielle systémique et de la fréquence cardiaque, l'autre est utilisée pour les prélèvements d'échantillons de sang artériel. Ces prélèvements d'échantillons sanguins sont réalisés pour la détermination des débits régionaux de perfusion myocardique par la technique des microsphères radioactives ainsi que pour évaluer la cinétique sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$.

Une thoracotomie est pratiquée au niveau du cinquième espace intercostal gauche. Le coeur est suspendu dans une bourse péricardique. Un cathéter en polyéthylène est inséré dans l'oreillette gauche pour les injections de microsphères. Un segment proximal de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) est disséqué sur 1 cm environ puis libéré de l'épicaarde. Une sonde implantable (model 200-367, Triton Technology) est placée sur l'IVA afin de suivre les variations du flux sanguin par effet doppler. Un fil de ligature (taille 2.0) est alors placé en amont de cette sonde. La pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) sont suivies et enregistrées sur un ordinateur (Merit Medical Systems).

5. Protocoles expérimentaux

Les protocoles expérimentaux sont représentés sur les figures 24 et 25. Compte tenu de l'effet vasodilatateur du vérapamil, les groupes contrôles consistent en des animaux subissant une infusion continue d'adénosine (0,20 mg/kg/min) (Sigma-Aldrich) afin de reproduire cet effet hémodynamique sans inhiber les canaux calciques.

5.1 Principe de la mesure des débits par la technique des microsphères radioactives

Les deux protocoles font appel à la technique des microsphères radioactives pour la mesure des débits sanguins myocardiques régionaux (Heymann 1977). Cette technique repose sur le principe suivant :

Les microsphères radioactives sont constituées de particules de carbone radiomarquées de 15 μm de diamètre. Lorsqu'elles sont injectées dans le ventricule gauche, elles circulent dans l'ensemble des artères de l'organisme et lors de leur premier passage dans les tissus, elles

restent bloquées au niveau des artérioles dont le diamètre est inférieur au leur. L'accumulation des microsphères au sein d'un tissu est donc directement proportionnelle au débit sanguin puisque la quantité de microsphères bloquées dans les artérioles de ce tissu dépend uniquement de la quantité de sang qui le traverse. Une pompe de débit connu D_{ref} , reliée à un cathéter artériel, permet de recueillir un échantillon sanguin contenant une activité A_{ref} en microsphères. Elle constitue un organe artificiel de référence de débit connu permettant d'établir la relation entre le débit et l'activité en microsphères. Cette relation permet de déterminer le débit sanguin myocardique régional de chacun des fragments de myocarde obtenus par la suite à partir de l'activité A_{myo} contenue dans chacun de ces morceaux.

$$D_{\text{myo}} = (D_{\text{ref}} * A_{\text{myo}}) / A_{\text{ref}}$$

Le débit est exprimé en ml/min/g.

Chaque lot de microsphères est constitué d'environ 3.10^6 microsphères dans 3 ml de sérum physiologique (PerkinElmer life sciences). Les microsphères sont marquées avec du ^{51}Cr , du ^{103}Ru , du ^{95}Nb ou du ^{46}Sc . L'ordre d'injection des différents lots est aléatoire. Avant leur administration dans l'oreillette gauche, les microsphères sont soniquées durant 30 minutes afin de dissocier les agrégats puis agitées manuellement pour homogénéiser la solution. Le prélèvement de sang artériel pour la collecte des microsphères débute 1 minute avant l'injection et se poursuit 2 minutes après, à un débit de 2,75 ml/min.

5.2 Groupe 1 : étude de la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans le myocarde sain

Lors de cette étude, 8 animaux sont utilisés. Après une période de stabilisation de 15 minutes, les paramètres hémodynamiques sont mesurés. Un premier lot de microsphères radioactives est ensuite injecté pour déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux à l'état basal (mic 1). Le vérapamil (0,015 mg/kg/min pendant 10 min, n = 4) ou l'adénosine (0,20 mg/kg/min, n = 4) est alors administré par voie intraveineuse. Quinze minutes après le début du traitement avec le vérapamil ou l'adénosine, et simultanément à un bolus de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (185 MBq), un second lot de microsphères est injecté par voie intraveineuse afin de déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux durant le traitement au temps d'injection du traceur (mic 2) (Figure 25).

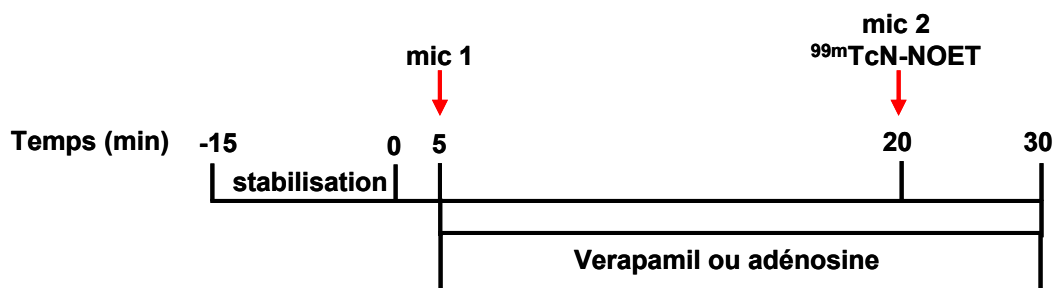


Figure 25. Protocole expérimental mis en œuvre pour les animaux du groupe 1 (Riou 1999).

A l'issue du protocole, 10 minutes après l'injection de TcN-NOET , les animaux sont euthanasiés par une injection de 20 ml de chlorure de potassium 10% (KCl) directement dans le ventricule gauche.

5.3 Groupe 2 : étude de la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans le myocarde ischémique

Dans le cadre de cette étude, 9 animaux sont utilisés. Après une période de stabilisation de 15 minutes, les paramètres hémodynamiques sont mesurés. Un premier lot de microsphères radioactives est injecté pour déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux à l'état basal (mic 1). L'artère coronaire IVA est partiellement ligaturée jusqu'à l'obtention d'une réduction de 70% du débit coronaire basal mesuré par la sonde Doppler. Cinq minutes après, un second lot de microsphères est injecté afin de déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux durant la sténose (mic 2). Le traitement au vérapamil (0,015 mg/kg/min pendant 10 min, $n = 4$) ou à l'adénosine (0,20 mg/kg/min, $n = 5$) démarre 5 minutes après. Le $^{99m}\text{TcN-NOET}$, le ^{201}Tl et un troisième lot de microsphères (mic 3) sont administrés simultanément 15 minutes après le début du traitement avec le vérapamil ou l'adénosine. Ce troisième lot de microsphères permet de déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux durant le traitement au temps d'injection des traceurs. La présence de la sténose sur l'IVA permet d'obtenir une large gamme de débits sanguins myocardiques régionaux depuis le territoire ischémique de l'IVA jusqu'au territoire sain irrigué par l'artère coronaire circonflexe. En conséquence, le protocole réalisé avec les animaux du Groupe 2 permet d'évaluer la corrélation entre la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et le débit de perfusion régional en absence ou en présence de vérapamil et de la comparer à celle du thallium-201, le traceur de référence (Figure 26).

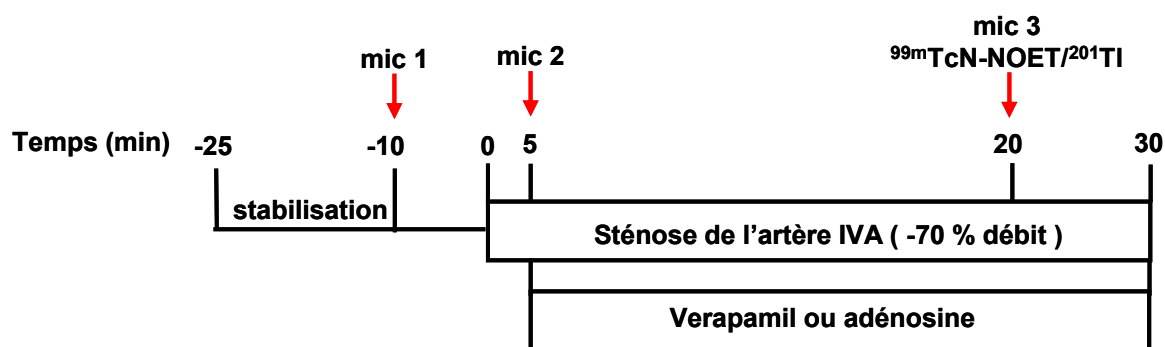


Figure 26. Protocole expérimental mis en œuvre pour les animaux du groupe 2.

A l'issue du protocole, 10 minutes après l'injection de ^{201}Tl et de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, les animaux sont euthanasiés par une injection de 20 ml de chlorure de potassium 10% (KCl) directement dans le ventricule gauche.

5.4 Cinétique sanguine

Des prélèvements sanguins sont effectués 30 secondes puis toutes les minutes suivant l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ jusqu'au sacrifice de l'animal afin de suivre la cinétique sanguine du traceur. La radioactivité contenue dans 0,5 ml de sang est comptée et les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale (% pic).

6 Analyses post-mortem

6.1 Détermination des débits sanguins myocardiques régionaux par la méthode des microsphères radioactives

A l'issue du protocole expérimental, le cœur est prélevé et le ventricule gauche est découpé en 5 tranches parallèles à la base du ventricule gauche épaisses de 1 cm environ (coupes « petit-axe »). Chaque tranche est ensuite découpée en 4 à 8 segments transmuraux. Chaque segment est subdivisé en 2 morceaux d'environ 1 gramme correspondant à l'endocarde et à l'épicarde. Au total, la dissection du cœur aboutie à l'obtention d'environ 80 segments myocardiques (Figure 27).

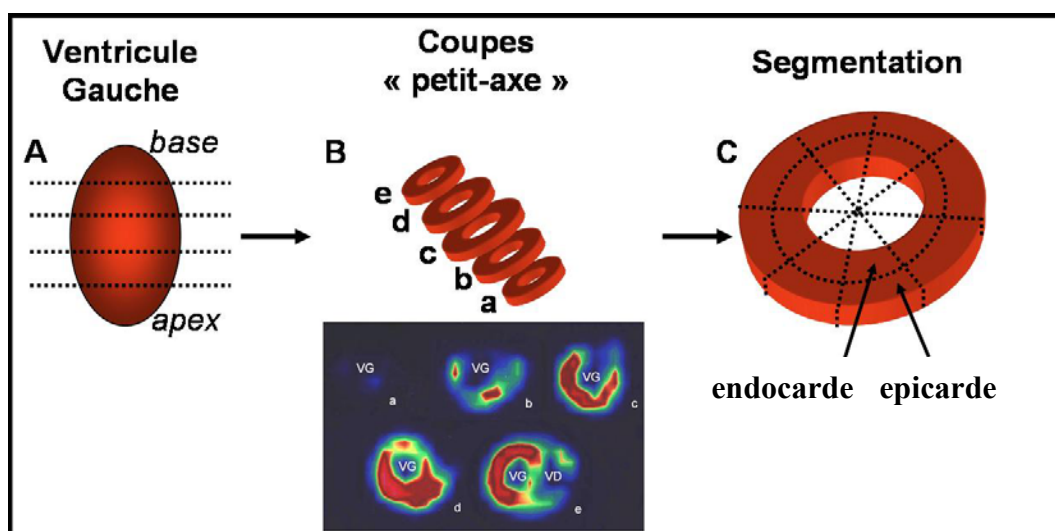


Figure 27. Découpage du cœur

Le cœur (A) est découpé en 5 tranches « petits-axe » (B). En bas, sur l'image scintigraphique de ces tranches réalisée à l'aide d'une gamma-caméra (15 minutes), on observe un défaut de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la région antérieure ischémique. Chaque tranche est découpée en 4 à 8 segments transmuraux, eux même découpés en endocarde et épicaide (C). (VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit)

La radioactivité du ^{201}Tl et/ou du ^{99m}Tc présente dans les segments myocardiques et les échantillons sanguins artériels est déterminée à l'aide d'un compteur gamma à scintillation (Cobra II, Packard Instruments) dans les 24 heures suivant l'injection des traceurs. Les fenêtres d'énergie utilisées pour ces comptages sont les suivantes : ^{201}Tl , 50-100 keV ; ^{99m}Tc , 120-180 keV. Les résultats obtenus sont exprimés en coups par minute (cpm).

La radioactivité correspondant aux microsphères radioactives est évaluée après la décroissance du ^{99m}Tc (4 jours après l'injection, soit 16 périodes), à l'aide du même compteur. Les fenêtres d'énergie pour les microsphères sont les suivantes : ^{51}Cr , 230-330 keV ; ^{103}Ru , 450-550 keV ; ^{95}Nb , 640-840 keV ; ^{46}Sc , 730-900 keV. Les résultats obtenus sont exprimés en cpm. Ils sont corrigés du bruit de fond, de la contamination entre les différents radionucléides, et de la décroissance radioactive liée au temps de comptage. Les débits sanguins myocardiques régionaux sont calculés en utilisant le logiciel PCGERDA (Scientific Computing Solutions). Ils sont normalisés au poids du morceau et exprimés en ml/min/g.

6.2 Quantification de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl

Les activités des seringues contenant les traceurs sont mesurées avant et après les injections à l'aide d'un activimètre (Capintec CRC-15R). Ceci permet de déterminer les doses injectées (DI) de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl . Ces DI sont normalisées au poids de l'animal et exprimées en nCi/kg.

La radioactivité (en cpm) contenue dans chaque segment myocardique est corrigée de l'intervalle de temps séparant l'injection du traceur du comptage de la radioactivité. Les captations des deux traceurs sont normalisées à la DI et au poids des échantillons (g). Les valeurs de fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sont donc exprimées en $(\text{cpm}/[\text{nCi/kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$ (Activité "brute"). Ces valeurs sont également exprimées après normalisation par le débit sanguin myocardique régional du segment myocardique concerné, déterminé en ml/min/g (Activité "normalisée").

Dans le Groupe 1, l'ensemble du myocarde est sain et les débits sont homogènes ; les résultats représentent donc la moyenne de l'ensemble des segments myocardiques. Dans le Groupe 2, une occlusion de l'IVA est réalisée et les segments dont le débit est $\leq 50\%$ du débit basal sont considérés comme ischémiques. Dans ce groupe, les activités myocardiques moyennes de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sont exprimées en $(\text{cpm}/[\text{nCi/kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$ ou en pourcentage de l'activité moyenne dans la zone saine. Les débits sanguins myocardiques régionaux sont exprimés en ml/min/g ou en pourcentage du débit moyen dans la zone saine.

6.3 Détermination de la concentration plasmatique en vérapamil.

Dans le Groupe 1, un échantillon de sang artériel de 1,5 ml est prélevé avant l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, soit 15 minutes après le début de l'infusion intraveineuse du vérapamil. Ce prélèvement est centrifugé (2 min à 1900 rpm, 4°C) et 0,5 ml de plasma sont utilisés pour la détermination de la concentration en vérapamil. Les protéines plasmatiques sont précipitées par l'ajout de 1 ml d'une solution de DOLE, composée de 2,5 % d'acide sulfurique (H_2SO_4) 1N et de 97,5 % d'isopropanol. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et 0,1 ml de d'acide sulfurique (H_2SO_4) 10N sont ajoutés afin d'abaisser le pH et de protoner le vérapamil. Après ajout de 1 ml d'heptane, agitation et centrifugation (2 min à 1000 rpm, température ambiante), 2 phases se forment. Le vérapamil chargé est dissout dans la phase aqueuse inférieure. 1 ml de cette phase est prélevée et neutralisée avec 0,9 ml de soude

(NaOH) 1N. 50 μl de cette solution sont alors analysés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec une colonne phase inverse C18. L'éluant est une solution de 65 % de tampon phosphate à 0,1 mmol/l et de 35 % d'acétonitrile (pH 7,4). Le débit de la pompe est fixé à 0,7 ml/min et l'absorbance est lue à 203 nm. Dans ces conditions, l'élution du vérapamil plasmatique survient après 21 minutes. L'efficacité d'extraction est déterminée par addition de quantités connues de vérapamil aux échantillons sanguins, et ces standards sont également traités pour la calibration (Riou 1999).

7. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SYSTAT (SYSTAT Software). Les analyses intra-groupes et inter-groupes sont réalisées par un test d'analyse de variance pour mesures répétées (ANOVA) ou un test unilatéral ANOVA, respectivement. Les résultats sont considérés comme statistiquement différents lorsque $P < 0,05$. Lorsqu'une significativité est observée avec le test d'analyse de variance pour mesures répétées (ANOVA), des analyses complémentaires intra-groupes sont réalisées avec un test de Bonferroni.

C. Résultats

1. Résultats du Groupe 1

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre de la thèse de science de Laurent Riou (Riou 1999).

1.1 Paramètres hémodynamiques

Les paramètres hémodynamiques des animaux du Groupe 1 sont présentés dans le Tableau 3. L'adénosine (0,20 mg/kg/min) et le vérapamil (0,015 mg/kg/min pendant 10 min) provoquent respectivement une diminution de 23 % et de 12 % de la pression artérielle moyenne (PAM) au temps de l'injection de TcN-NOET (en comparaison de la PAM basale : $P=NS$). La fréquence cardiaque n'est pas affectée par le traitement à l'adénosine ou au vérapamil. Les résultats de la CLHP indiquent que la concentration plasmatique en vérapamil est de 290 ± 152 ng/ml au moment de l'injection de TcN-NOET.

	Pression artérielle moyenne (mmHg)			Fréquence cardiaque (bpm)		
	Basal	Sténose	Traitement	Basal	Sténose	Traitement
Groupe 1						
Adénosine	119 ± 19	-	92 ± 19	131 ± 10	-	133 ± 12
Vérapamil	103 ± 22	-	91 ± 20	148 ± 11	-	151 ± 15
Groupe 2						
Adénosine	111 ± 23	72 ± 10*	71 ± 10*	114 ± 25	109 ± 20	109 ± 20
Vérapamil	96 ± 16	83 ± 17	63 ± 7*†	104 ± 8	102 ± 7	82 ± 6*†

Tableau 3. Paramètres hémodynamiques.

L'adénosine est infusée à la dose de 0,20 mg/kg/min. Le vérapamil est injecté à la dose de 0,015 mg/kg. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne ± SEM. * $P < 0,05$ vs basal, † $P < 0,05$ vs Sténose.

1.2 Comportement de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

a. Cinétique sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

La figure 28 représente l'évolution de l'activité sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux traités à l'adénosine ou au vérapamil. Il n'y a pas de différence significative entre les 2 cinétiques.

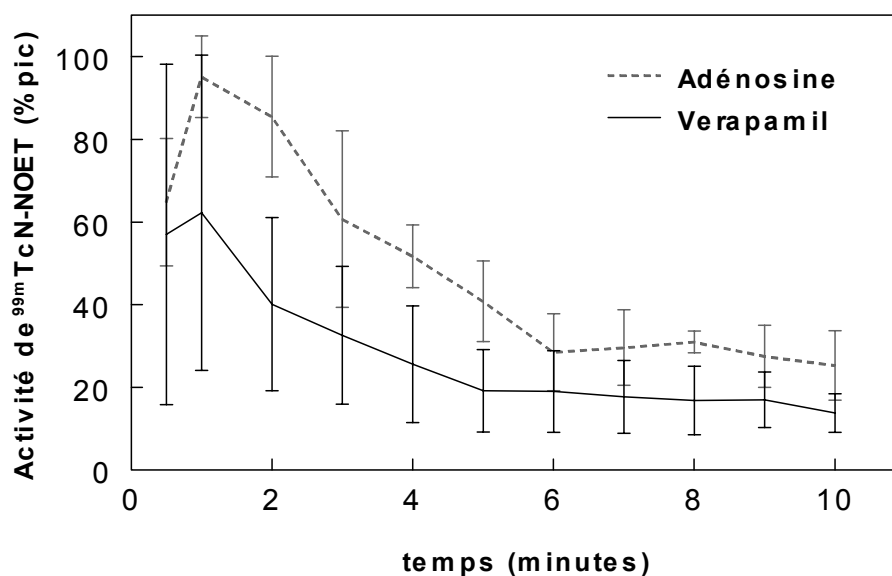


Figure 28. Cinétique sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux du Groupe 1.

b. Débits sanguins myocardiques et captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Les résultats sont présentés sur la Figure 29. Le débit basal est légèrement inférieur chez les chiens traités avec l'adénosine que chez les chiens traités avec le vérapamil ($0,92 \pm 0,01$ et $1,03 \pm 0,02$ ml/min/g respectivement, $P < 0,05$). Les infusions d'adénosine et de vérapamil induisent des augmentations significatives du débit (74 % et 64 % respectivement, $P < 0,001$ vs débit basal). Au temps de l'injection de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, les débits sanguins myocardiques régionaux des animaux traités avec l'adénosine ou avec le vérapamil ne sont pas significativement différents ($1,61 \pm 0,04$ et $1,69 \pm 0,03$ ml/min/g respectivement, $P = \text{NS}$). La captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est pas inhibée par le traitement au vérapamil.

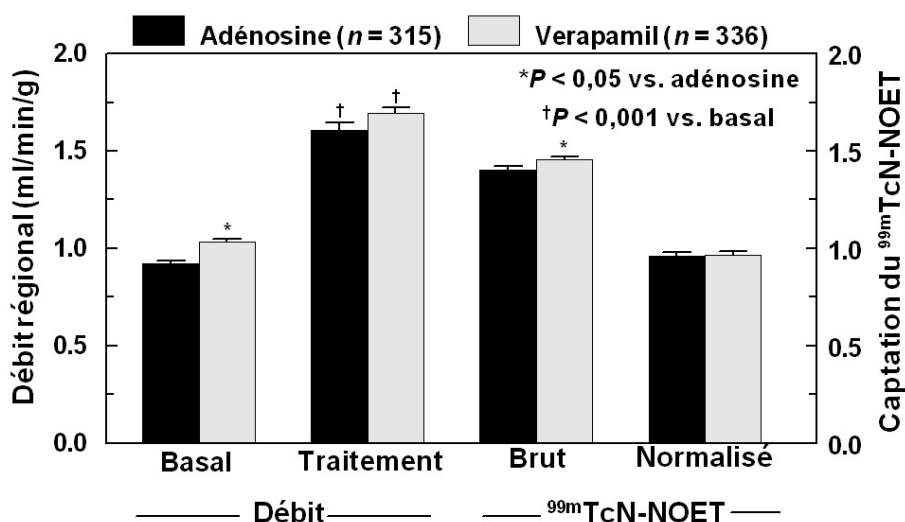


Figure 29. Débits sanguins myocardiques régionaux et captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux du Groupe 1.

Les animaux sont traités soit à l'adénosine, soit au vérapamil. Les résultats de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sont exprimés soit en $(\text{cpm}/[\text{nCi}/\text{kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$ (Brut), soit après normalisation au débit sanguin régional (Normalisé).

Une augmentation de 3,8 % de la captation du traceur est observée entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil ($1,4 \pm 0,2$ et $1,5 \pm 0,1$ $(\text{cpm}/[\text{nCi}/\text{kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$, $P = 0,04$). Cette augmentation apparaît en présence d'un débit sanguin myocardique régional supérieur de 5,3 % chez les animaux traités avec l'adénosine par rapport aux animaux traités avec le vérapamil ($P = 0,06$). Après normalisation de la captation du traceur au débit sanguin régional, aucune différence significative de l'activité myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est observée entre les animaux traités avec l'adénosine et ceux traités avec le vérapamil (Figure 29).

2. Résultats du Groupe 2

2.1 Paramètres hémodynamiques

Les paramètres hémodynamiques des animaux du Groupe 2 sont présentés dans le Tableau 1. La sténose réalisée sur l'artère IVA entraîne une diminution de la pression artérielle moyenne (PAM) de 35 % chez les animaux traités avec l'adénosine ($P < 0,05$ vs PAM basale) et de 14 % chez les animaux traités avec le vérapamil ($P = \text{NS}$ vs PAM basale). Le traitement avec l'adénosine n'affecte pas la PAM, alors que le vérapamil entraîne une nouvelle diminution de

25 % de la PAM ($P < 0,05$ vs. PAM sténose). Au moment des injections de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl , les PAM ne sont pas significativement différentes entre le groupe d'animaux traités avec l'adénosine et le groupe d'animaux traités avec le vérapamil. La fréquence cardiaque n'est pas affectée par la sténose de l'IVA ni par l'adénosine. En revanche, le vérapamil diminue la fréquence cardiaque (FC) de 23 % ($P < 0,05$ vs FC sténose).

2.2 Comportement de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

a. Cinétique sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

La figure 30 représente l'évolution de l'activité sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux traités à l'adénosine ou au vérapamil. Il n'y a pas de différence significative entre les 2 cinétiques.

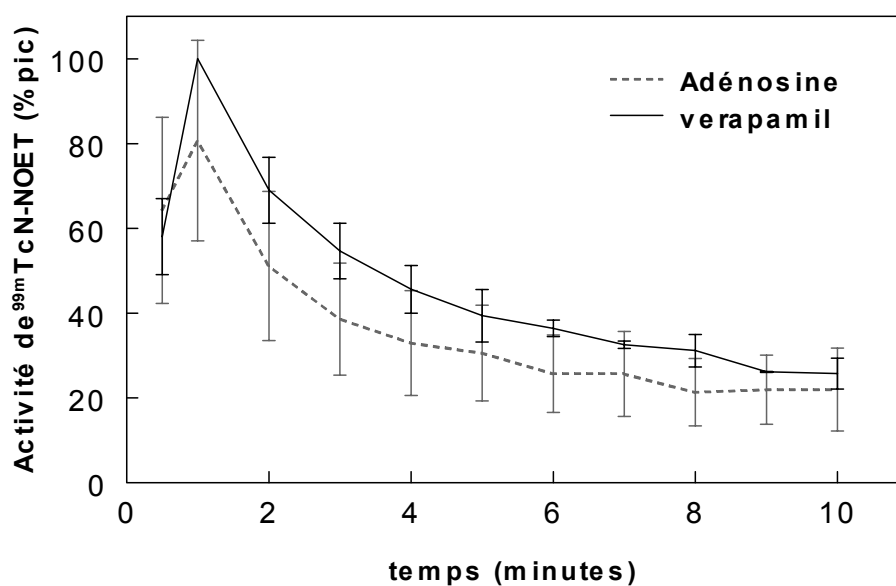


Figure 30. Cinétique sanguine de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux du Groupe 2.

b. Débits sanguins myocardiques et captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ **(a) Région saine**

Les résultats sont présentés dans la figure 31. Dans la région saine, les débits sanguins myocardiques régionaux mesurés à l'état basal ne sont pas statistiquement différents entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil ($1,02 \pm 0,05$ et $0,98 \pm 0,04$ ml/min/g respectivement, $P = \text{NS}$). Après la mise en place de la sténose, les débits sanguins diminuent chez les animaux traités avec l'adénosine ($0,85 \pm 0,04$ ml/min/g, $P < 0,05$ vs basal) et restent inchangés chez les chiens traités avec le vérapamil ($0,96 \pm 0,07$ ml/min/g, $P = \text{NS}$ vs basal). L'adénosine et le vérapamil ne modifient pas les débits sanguins myocardiques régionaux des animaux du Groupe 2. Les débits sanguins myocardiques régionaux de la région saine ne sont pas statistiquement différents au moment de l'injection des traceurs entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil. Dans ces conditions, il n'existe pas de différence significative de la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la région saine entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil ($1,03 \pm 0,02$ et $1,11 \pm 0,05$ (cpm/[nCi/kg]/g). 10^{-1} respectivement, $P = \text{NS}$).

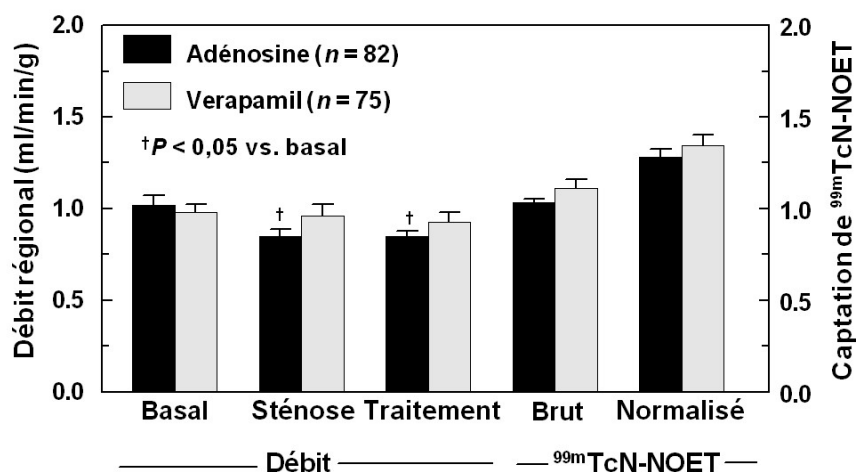


Figure 31. Débits sanguins myocardiques régionaux et captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux du Groupe 2 dans la région saine.

Les animaux sont traités soit à l'adénosine, soit au vérapamil. Les résultats de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sont exprimés soit en (cpm/[nCi/kg]/g). 10^{-1} (Brut), soit après normalisation au débit sanguin régional (Normalisé).

(b) Région ischémique

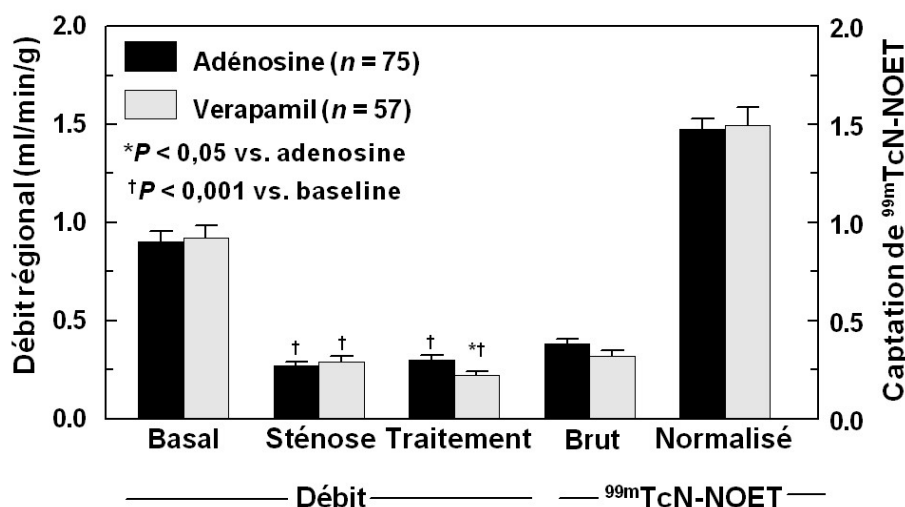


Figure 32. Débits sanguins myocardiques régionaux et captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les animaux du Groupe 2 dans la région ischémique.

Les animaux sont traités soit à l'adénosine, soit au vérapamil. Les résultats de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sont exprimés soit en $(\text{cpm}/[\text{nCi}/\text{kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$ (Brut), soit après normalisation au débit sanguin régional (Normalisé).

Les résultats sont présentés dans la figure 32. Dans la zone ischémique, les débits sanguins myocardiques régionaux mesurés à l'état basal ne sont pas statistiquement différents entre le groupe d'animaux traités avec l'adénosine et le groupe d'animaux traités avec le vérapamil ($0,90 \pm 0,05$ et $0,92 \pm 0,06$ ml/min/g respectivement). Après la mise en place de la sténose, les débits sanguins myocardiques régionaux diminuent de 70% dans les deux groupes d'animaux ($0,27 \pm 0,02$ ml/min/g pour le groupe adénosine et $0,29 \pm 0,03$ ml/min/g pour le groupe vérapamil; $P < 0,001$ vs basal). Le traitement avec l'adénosine n'affecte pas les débits régionaux ($0,29 \pm 0,03$ ml/min/g), alors que le vérapamil entraîne une nouvelle diminution des débits ($0,22 \pm 0,02$ ml/min/g, $P < 0,05$ vs Sténose). Les débits sanguins myocardiques régionaux de la région ischémique sont légèrement supérieurs chez les animaux traités avec l'adénosine que chez les animaux traités avec le vérapamil ($P < 0,05$). La captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la région ischémique n'est pas statistiquement différente entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil ($0,38 \pm 0,03$ et $0,32 \pm 0,03$ $(\text{cpm}/[\text{nCi}/\text{kg}]/\text{g}) \cdot 10^{-1}$ respectivement, $P = \text{NS}$). De même, après normalisation de la captation du traceur au débit sanguin régional, aucune différence significative de l'activité

myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est observée entre les animaux traités avec l'adénosine et les animaux traités avec le vérapamil (Figure 32).

c. Captations myocardiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl et débits myocardiques

Les résultats obtenus avec les animaux du groupe 2 sujets à une sténose coronaire, sont présentés sur les Figures 33 et 34. Les captations de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sont significativement corrélées avec les débits sanguins myocardiques régionaux. Ces corrélations sont observées aussi bien chez les animaux traités à l'adénosine ($r = 0,98$ et $r = 0,97$ pour $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et pour le ^{201}Tl respectivement, $P < 0,001$) que chez les animaux traités au vérapamil ($r = 0,98$ et $0,96$ pour $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et pour le ^{201}Tl respectivement, $P < 0,001$).

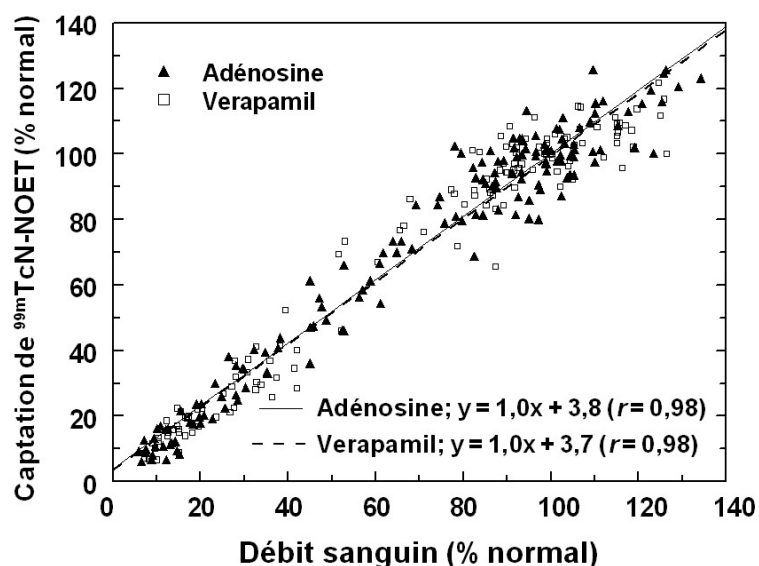


Figure 33. Corrélation entre la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et les débits sanguins myocardiques régionaux chez les animaux sujets à une sténose de l'IVA.

Pour chaque animal, les captations myocardiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et les débits sanguins myocardiques régionaux sont exprimés en pourcentage de l'activité moyenne et du débit sanguin moyen déterminés dans la région saine non-ischémique.

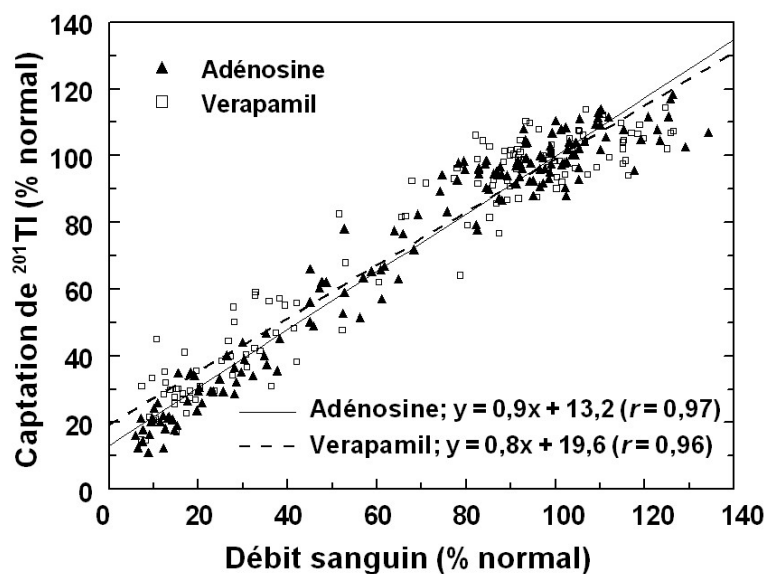


Figure 34. Corrélation entre la captation myocardique de ^{201}Tl et les débits sanguins myocardiques régionaux chez les animaux sujets à une sténose de l'IVA.

Pour chaque animal, les captations myocardiques de ^{201}Tl et les débits sanguins myocardiques régionaux sont exprimés en pourcentage de l'activité moyenne et du débit sanguin moyen déterminés dans la région saine non-ischémique.

D. Discussion

$^{99m}\text{TcN-NOET}$ est un traceur technétié de la perfusion myocardique. Des études *in vitro* ont montré que sa captation cellulaire était liée aux mouvements calciques, puisque des inhibiteurs des canaux calciques tels que le vérapamil et le diltiazem inhibent sa captation de 40 % sur un modèle de cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Riou 1998). Compte tenu de l'utilisation fréquente des antagonistes calciques en pratique clinique, cette étude a été entreprise afin d'évaluer l'effet d'un de ces inhibiteurs des canaux calciques, le vérapamil, sur la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* chez le chien.

1. Dosage du vérapamil

Le vérapamil inhibe les canaux calciques voltages-dépendants des cellules musculaires lisses vasculaires, induisant ainsi une vasorelaxation. Dans notre étude, l'infusion de vérapamil à 0,015 mg/kg/min pendant 10 min se traduit par une concentration plasmatique de cette drogue de 290 ± 152 ng/ml. Chez les patients traités chroniquement avec le vérapamil, sa concentration plasmatique est de 120 ± 20 ng/ml (Verschraagen 1999). Ainsi, la dose de vérapamil utilisée dans cette étude permet d'atteindre une concentration plasmatique de l'antagoniste calcique comparable à celle observée en pratique clinique.

2. Choix du traitement pour le groupe contrôle

Les animaux contrôles sont perfusés avec de l'adénosine de façon à reproduire l'augmentation du débit induite par le vérapamil. L'adénosine est un métabolite endogène qui exerce une action vasodilatatrice sans inhiber les canaux calciques voltage-dépendants. Il se fixe sur les récepteurs A_2 des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires (Mugbawa 1996). Sa fixation aux cellules endothéliales entraîne la synthèse de monoxyde d'azote (NO) qui provoque la vasorelaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes. Un effet vasorelaxant direct sur les cellules musculaires lisses par activation des canaux potassiques ATP-sensibles a également été mis en évidence par Schryock et al (1997). En raison de sa courte demie-vie sanguine (quelques secondes), l'adénosine est administrée par infusion intraveineuse (Moser 1998). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'adénosine est sans effet sur l'extraction myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (Calnon 1999).

3. Groupe 1 : étude de la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans le myocarde sain

3.1 Paramètres hémodynamiques

Chez les animaux qui ne sont pas soumis à une sténose coronaire (Groupe 1), la diminution de la pression artérielle moyenne de 10 % environ induite par l'injection du vérapamil est comparable à celle observée par Pagel et al. (1998) après une injection intraveineuse en bolus de 0,1 ou 0,2 mg/kg de cet inhibiteur calcique sur le même modèle expérimental.

Le vérapamil induit également une augmentation des débits sanguins myocardiques régionaux d'environ 65 %, similaire à celle décrite par Neugebauer et al. avec la même dose d'inhibiteur (Neugebauer 1978).

3.2 Comportement de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

Aucune inhibition de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est observée en présence de vérapamil. En revanche, une élévation de 3,8 % de la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est observée chez les animaux traités avec le vérapamil comparativement aux animaux traités avec l'adénosine ($P = 0,04$). Cette augmentation peut s'expliquer par la différence de débit de 5,3 % entre les deux groupes d'animaux lors de l'injection de TcN-NOET ($p = 0,06$). L'absence d'effet du vérapamil est confirmée après normalisation de la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ au débit sanguin myocardique régional.

4. Groupe 2 : étude de la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans le myocarde ischémique

4.1 Paramètres hémodynamiques

Les animaux du Groupe 2 sont sujets à une diminution de 70 % du débit de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) de façon à évaluer l'effet du vérapamil sur la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans le myocarde ischémique.

La diminution de la pression artérielle moyenne après la réalisation de la sténose est similaire à celle décrite par Thuillez et al. après une diminution de 60 à 75 % du débit sanguin dans l'artère coronaire circonflexe (Thuillez 1983). Le débit dans la région saine est significativement diminué chez les animaux traités avec l'adénosine, probablement en raison d'une plus grande diminution de la pression artérielle moyenne. Néanmoins, les débits dans

les régions saines des animaux traités avec l'adénosine ou avec le vérapamil restent compris dans une gamme de débits normaux (0,8 ml/min/g à 1,2 ml/min/g). Le débit sanguin myocardique régional est significativement diminué de 70 % dans la zone ischémique de l'IVA pour les deux groupes de chiens.

Le débit myocardique dans la région saine n'est pas affecté par le vérapamil, ce qui est en accord avec les résultats de Urquhart et al. avec la même dose d'inhibiteur sur un modèle d'occlusion coronaire subtotale réalisée chez le chien (Urquhart 1984). En revanche, le débit est significativement diminué dans la région ischémique sous l'action du vérapamil, comme l'ont décrit Thuillez et al. (1983). Les effets du vérapamil sur les débits sanguins myocardiques régionaux peuvent être expliqués par le fait que les mesures sont réalisées rapidement (15 min) après le début du traitement, c'est à dire lorsque la diminution de la pression artérielle moyenne (PAM) induite par le vérapamil est maximale. La diminution maximale de la PAM sous l'effet du vérapamil, et la diminution de la pression de perfusion coronaire qui en résulte sont concomitantes d'effets inotropes négatifs précoces et peuvent entraîner une diminution transitoire du débit dans la zone ischémique, de même qu'un défaut dans l'effet vasodilatateur du vérapamil dans la zone saine (Thuillez 1983). La diminution de la PAM résultant de la sténose de l'IVA étant plus importante dans le groupe d'animaux traités à l'adénosine, ceci pourrait expliquer l'incapacité de l'adénosine à augmenter les débits sanguins myocardiques (Bellamy 1978). Enfin, au temps de l'injection des traceurs, les débits sanguins myocardiques dans les régions saines ne sont pas statistiquement différents entre les groupes d'animaux traités à l'adénosine et au vérapamil. En revanche, dans la région ischémique, ils sont diminués de 24 % chez les animaux traités au vérapamil par rapport aux animaux traités à l'adénosine.

4.2 Comportement de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

La captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est normalisée au débit sanguin myocardique afin de tenir compte de la différence de débit dans la zone ischémique entre les groupes d'animaux traités à l'adénosine et au vérapamil au temps d'injection du traceur. Les résultats indiquent que la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'est pas inhibée par le vérapamil, aussi bien dans la région saine que dans la région ischémique. Comme l'indiquent les figures 33 et 34, la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, de même que celle du ^{201}Tl , est fortement corrélée aux débits sanguins myocardiques régionaux chez les animaux traités à l'adénosine comme chez les

animaux traités au vérapamil. Ces résultats confirment l'absence d'effet du vérapamil sur la captation *in vivo* de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sur notre modèle expérimental.

5. La fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$

5.1 Résultats des études antérieures

Sur un modèle de cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, les mécanismes de captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sont liés aux mouvements calciques puisque des inhibiteurs de ces canaux, tels que le vérapamil ou le diltiazem, diminuent de 40 % la fixation de ce traceur (Riou 1998). Cependant, cet effet des inhibiteurs calciques sur la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ n'a pas été retrouvé sur le modèle du cœur isolé et perfusé de rat (Riou 2000). Une étude de la distribution subcellulaire de ce traceur par ultracentrifugations différentielles suggère que $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est localisée au niveau de la membrane plasmique (Uccelli 1995). D'autre part, des études réalisées sur le modèle du cœur isolé et perfusé de rat ont montré que la cinétique myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est immédiatement modifiée par l'ajout dans le liquide de perfusion d'un détergent (Triton-X100), de cyanide, de globules rouges ou d'albumine (Johnson 1996, Johnson 1997). De plus, la présence dans le liquide de perfusion d'albumine est suffisante pour accélérer le lavage myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, et cette augmentation est plus importante lorsque des lipides sont liés à l'albumine (Riou 2003). Ce mouvement bidirectionnel de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre le sang et le myocarde a également été mis en évidence *in vivo* chez le chien. Sur ce modèle, le lavage de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est augmenté par l'infusion intraveineuse de lipides ainsi que par une élévation du débit sanguin (Riou 2003). Cette accessibilité immédiate du traceur au liquide de perfusion indique qu'il se trouve probablement localisé au niveau de l'endothélium vasculaire. L'ensemble des résultats obtenus dans ces différentes études suggère donc que le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est localisé au niveau de la membrane plasmique de l'endothélium vasculaire et qu'il réalise des échanges bidirectionnels avec les éléments du sang.

5.2 Résultats de l'étude

Les résultats obtenus dans la présente étude indiquent que les mécanismes de captation cellulaire de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ déterminés *in vitro* sur des cardiomyocytes de rat nouveau-nés ne se retrouvent pas *in vivo* chez le chien. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'une fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ au niveau de la membrane plasmique de l'endothélium vasculaire. En effet, les cellules endothéliales n'expriment pas de canaux calciques voltage-dépendants (Takeda 1987), ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet des inhibiteurs de ces canaux sur la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* chez le chien dans la présente étude, ainsi que sur le modèle *ex vivo* de cœur isolé et perfusé de rat (Riou 2000).

6. Limitations

Il existe plusieurs limitations à cette étude. Premièrement, l'anesthésique utilisé est le pentobarbital monosodique, ou thiopental. Or, il a été montré que cet anesthésique pouvait affecter les courants ioniques. Son effet sur les canaux calciques voltage-dépendants reste néanmoins controversé (Hattori 1987, Mousa 2000). De plus, même s'il existe une possibilité pour que l'anesthésique affecte la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, cet effet est identique dans les différents groupes d'animaux et ne devrait donc pas masquer un effet du vérapamil par rapport à l'adénosine. Deuxièmement, la dose de vérapamil utilisée dans la présente étude est inférieure à celle utilisée lors des études réalisées *in vitro* sur le modèle de cardiomyocytes. *In vitro*, la dose de vérapamil était suffisante pour inhiber totalement la contraction des cardiomyocytes en culture, alors que la contraction est maintenue dans la présente étude. Ceci pourrait fournir une explication alternative pour expliquer le fait que les résultats obtenus *in vitro* ne se retrouvent pas *ex vivo* et *in vivo*. En effet, la proportion de canaux calciques bloqués *in vivo*, inférieure à la proportion de ces canaux bloqués *in vitro*, pourrait être insuffisante pour inhiber la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$. Enfin, la dose de vérapamil utilisée n'induit que très peu d'effet sur la pression artérielle moyenne et sur la fréquence cardiaque des animaux du groupe 1. Bien que la concentration plasmatique du vérapamil soit comparable à la concentration observée chez l'homme en pratique clinique, il est possible que la dose effective soit plus élevée chez le chien. Cependant, le fait que le vérapamil augmente le débit sanguin myocardique de 64 % indique que le vérapamil semble être efficace à la dose utilisée.

E. Conclusion et implication clinique

Contrairement aux résultats obtenus lors des études réalisées *in vitro* par Riou et al. sur des cardiomyocytes de rat nouveau-nés en culture, indiquant que des inhibiteurs des canaux calciques voltage-dépendants tels que le vérapamil ou le diltiazem inhibent la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, le vérapamil n'inhibe pas la fixation de ce traceur *in vivo* chez le chien dans le myocarde sain ou ischémique. Ces résultats suggèrent que le vérapamil n'affectera pas la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ chez les patients sujets à un examen d'imagerie scintigraphique de la perfusion myocardique.

II. Evaluation des captations myocardiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du Thallium-201 *in vivo* sur des modèles expérimentaux chroniques d'ischémie reperfusée ou non-reperfusée chez le rat.

A. Introduction

Le $^{99m}\text{TcN-NOET}$, ou *N*-éthoxy-*N*-éthyl-dithiocarbamate-nitrido- ^{99m}Tc , est un radiotracer de la perfusion myocardique (Pasqualini 1994). Cette molécule est neutre et lipophile. *In vivo* chez le chien, sur des modèles aigus d'ischémie coronaire transitoire ou permanente, les cinétiques myocardiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ sont identiques à celles du thallium-201 (^{201}Tl), le radiotracer de référence de la perfusion et de la viabilité myocardique (Ghezzi 1995, Vanzetto 1997, Calnon 1999). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme (Vanzetto 2000, Fagret 1995). Cependant, Vanzetto et al. ont montré que la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ reflète les débits sanguins myocardiques régionaux et non la viabilité sur un modèle aigu d'infarctus du myocarde reperfusé chez le chien (Figure 35) (Vanzetto2000⁽²⁾).

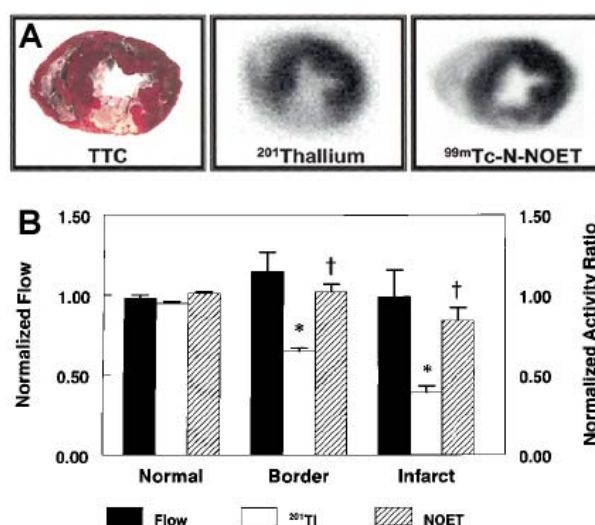


Figure 35. NOET est plus un marqueur du débit que de la viabilité myocardique.

A : Dans la phase aiguë de l'infarctus reperfusé chez le chien, la fixation du ^{201}Tl est corrélée à la viabilité déterminée par la coloration au TTC. En revanche, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ se répartit dans le myocarde en fonction du débit et se fixe y compris dans la zone infarctée (région blanche sur l'image TTC)

B : 65 minutes après la levée de l'occlusion, et malgré la persistance du débit sanguin, la captation du ^{201}Tl est fortement réduite dans la zone infarctée. En revanche, la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, significativement plus élevée que celle du ^{201}Tl dans la zone infarctée et en bordure de cette zone, reflète plus le débit sanguin myocardique (Vanzetto 2000⁽²⁾).

Selon les auteurs, en raison de sa nature neutre et lipophile, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ se lie de manière non spécifique dans le tissu infarci au temps précoce de reperfusion en fonction du débit. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur un modèle de cardiomyocytes de rats nouveau-nés indiquant que la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est indépendante de la viabilité cellulaire (Riou 1998).

Rivas et al. ont étudié chez le chien la corrélation entre le débit et la viabilité sur un modèle d'ischémie myocardique induite par une ligature coronaire permanente. Ils ont montré qu'il existe une corrélation linéaire inverse entre les débits sanguins myocardiques, mesurés entre 45 secondes et 24 heures suivant l'ischémie myocardique, et la taille de la zone infarctée déterminée histologiquement 6 jours après (Rivas 1976). De plus, le phénomène de non-reperfusion (ou « no reflow ») a été largement décrit. Il se traduit par le fait qu'un territoire infarci est souvent reperfusé de manière incomplète (Kloner 1974, Reffelmann 2003). Il a également été mis en évidence lors de la reperfusion d'un territoire ischémique, que la diminution progressive des débits sanguins myocardiques régionaux est corrélée avec la progression de la nécrose myocardique au sein de ce territoire précédemment ischémique (Ambrosio 1989, Matsumura 1998, Rochitte 1998). L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe une corrélation entre le débit et la viabilité myocardique aux temps longs dans les territoires infarcis non-reperfusés ou reperfusés. Nous avons donc fait l'hypothèse que contrairement aux résultats obtenus par Vanzetto et al. aux temps précoces de reperfusion, la captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, traceur pur du débit, reflèterait la viabilité myocardique et serait donc corrélée à la captation du ^{201}Tl aux temps tardifs. Dans le but de valider cette hypothèse, les captations myocardiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl ont été étudiées chez le rat sur des modèles chroniques d'infarctus du myocarde reperfusé ou non-reperfusé.

B. Matériel et méthodes

1. Préparation des radiotraceurs

1.1 $^{99m}\text{TcN-NOET}$:

Le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (Figure 36) est préparé à partir d'un kit fourni par CIS bio International – Schering S.A comme décrit précédemment (Chap I B 1 1.1)

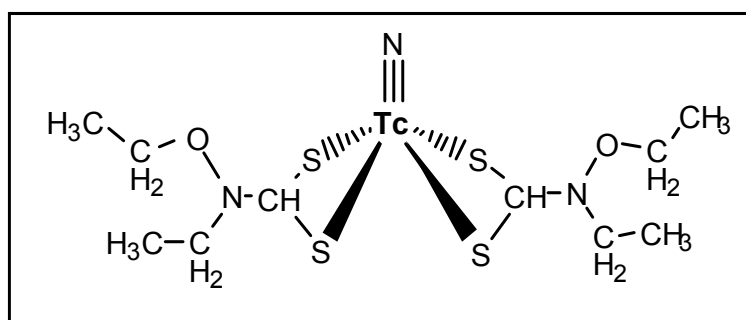


Figure 36. Formule développée de TcN-NOET.

La solution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est purifiée sur une résine échangeuse d'anions (Bio-Rad AG-1 X8, 200-400 Mesh, chloride form) afin d'éliminer les ligands dithiocarbamates libres chargés négativement.

1.2 $^{125}\text{I-SAB}$:

37 MBq d'iode 125 et 20 μl de chloramine T (1 mg/ml) sont incubés 1 heure à température ambiante avec 0,4 ml d'une solution d'albumine sérique bovine 10% (BSA, Sigma-Aldrich). La réaction est stoppée avec 40 μl de pyrosulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (4 mg/mL). La solution de $^{125}\text{I-BSA}$ est purifiée avec une résine échangeuse d'anion (Bio-Rad AG-1 X8, 200-400 Mesh, chloride form).

1.3 $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ et ^{201}Tl :

Le kit de marquage de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) ainsi que le ^{201}Tl sont fournis par CIS bio International – Schering S.A.

2. Etudes in vitro

Des échantillons de sang veineux provenant de 6 donneurs humains sont utilisés (Centre de Transfusion Sanguine, Grenoble). Des aliquotes de 2 ml de sang total sont incubés à 37°C pendant 10 minutes en présence de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ($34,4 \pm 9,4$ MBq) ou de ^{201}Tl ($11,5 \pm 1,0$ MBq) puis centrifugés (5 min/4000 rpm/20°C) afin de séparer les fractions plasmatiques et cellulaires. Les activités en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ou en ^{201}Tl de chacune des fractions recueillies sont déterminées à l'aide d'un activimètre (Capintec CRC-15R, Aries) puis exprimées en pourcentage de l'activité incubée dans le sang total (% du sang total).

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Lowry modifiée (Lowry 1951) :

- L'échantillon plasmatique à doser est placé 30 minutes à 70°C.
- 0,2 ml de plasma sont prélevés et incubés 10 minutes dans une cuve de spectrophotomètre avec 1 ml de solution C obtenue extemporanément par un mélange 5 : 1 des solutions A et B (Sol A : bicarbonate de sodium 20 g/l, d'hydroxyde de sodium 4 g/l. Sol B : sulfate de cuivre pentahydré 5 g/l, citrate de sodium 10 g/l).
- La solution obtenue est incubée 30 minutes à l'obscurité à température ambiante avec 100 μl de Folin 50%.
- La concentration en protéines est déduite de l'absorbance de la solution à 640 nm (Ultraspect II, LKB Biochrom). Pour cela, une courbe étalon est réalisée avec une gamme de concentrations connues en albumine sérique bovine.

Dans une seconde série d'expériences, après l'incubation des radiotraceurs dans le sang total et la séparation des fractions plasmatiques et cellulaires, les protéines contenues dans la fraction plasmatique sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique (TCA 10%, 0,3 ml/ml de plasma). La fraction aqueuse est alors séparée de la fraction protéique par centrifugation (30 min/2800 g/20°C). La répartition plasmatique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et de ^{201}Tl entre la phase aqueuse sans protéine et la fraction protéique est déterminée comme précédemment par comptage de la radioactivité. Elle est exprimée en pourcentage de l'activité plasmatique totale (% plasma).

3. Etudes *in vivo*

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique du Centre de Recherche et Service de Santé des Armées (CRSSA) de Grenoble.

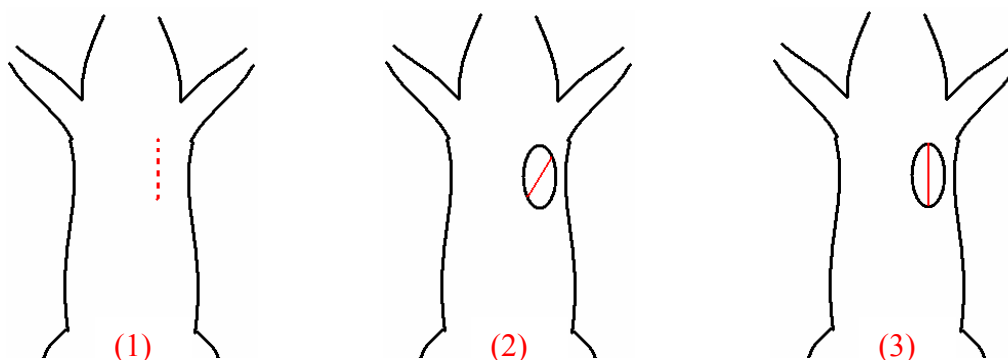
3.1 Chirurgie

19 rats mâles de souche Wistar sont utilisés pour cette étude. Le poids moyen des animaux est de 314 ± 11 g.

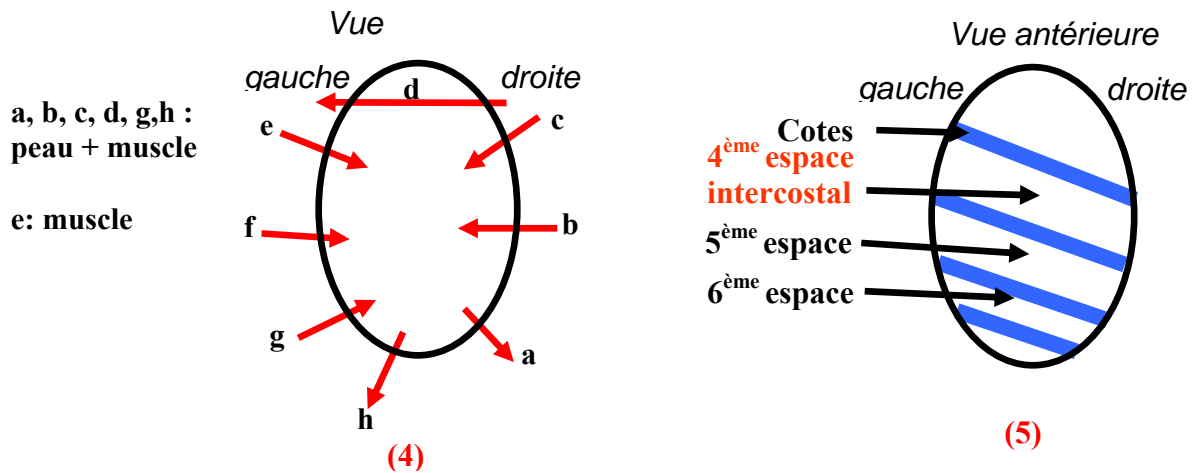
a. Préparation de la chirurgie

L'anesthésie est induite par une injection intra-péritonéale d'un mélange de xylazine (10 mg/kg) (Rompun, Centravet) et de kétamine (50 mg/kg) (Malgene, Centravet) préparé extemporanément dans la seringue. L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal et sa température corporelle est maintenue à $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ à l'aide d'une couverture chauffante (Harvard apparatus). Afin de pouvoir réaliser une thoracotomie, l'animal est intubé oralement et ventilé à l'air ambiant à l'aide d'un respirateur dédié au petit animal (10 mL/kg, 70 cycles/min) (Harvard Apparatus Model 683).

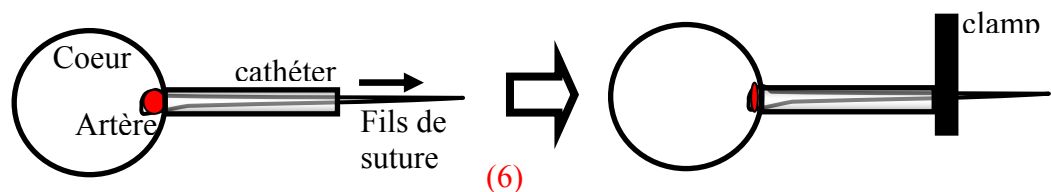
b. Protocole chirurgical



- La zone à inciser est rasée, puis une incision de 2 cm environ est réalisée à l'aide de ciseaux droits (1).
- Les plans musculaires sont écartés à l'aide de ciseaux droits et le tissu conjonctif est dilacéré à l'aide de pinces (2 et 3)



- Les plans sont maintenus écartés à l'aide d'une bourse d'attente (4).
- Une incision est réalisée au niveau du 4^{ème} espace intercostal à l'aide de ciseaux courbes à bouts arrondis (5).
- Les poumons sont écartés délicatement, et le péricarde est déchiré à l'aide de pinces.
- Le cœur est extériorisé par une pression manuelle sur la cavité thoracique et un fil de suture (5.0) est très rapidement passé sous l'artère coronaire interventriculaire dans sa région proximale.
 - o Ischémie permanente : Pour réaliser une ischémie non reperfusée, la ligature est réalisée en nouant le fil de suture. Le cœur est ensuite immédiatement remplacé dans la cavité thoracique (groupe OCC ; n = 8).
 - o Ischémie transitoire : Pour réaliser une ischémie reperfusée, le cœur est remplacé dans la cavité thoracique sans nouer le fil de suture. Puis les deux extrémités du fil sont insérées dans un cathéter (longueur : 3 cm, diamètre interne : 1 mm) arrondi du côté du cœur par chauffage afin ne pas endommager le tissu myocardique. La ligature est alors réalisée en poussant le cathéter contre l'artère et en le maintenant durant 45 minutes à l'aide d'un clamp (6) (groupe REP ; n = 11).



- La bourse d'attente est retirée et l'espace intercostal est refermé avec un point de suture (5.0).
- Le second volet musculaire est remis en place et simultanément une pression manuelle est exercée sur la cage thoracique pour expulser l'air et rétablir le vide pleural. Un point de suture permet de maintenir ces plans musculaires fermés (suture Tevdek n° 2; Deknatel).
- La peau est ensuite recousue et la plaie est nettoyée avec de la bétadine.

Une injection intramusculaire de 100 $\mu\text{l/kg}$ d'un antidote de la xylazine (Chlorhydrate d'atipanozol, Centravet) permet de mettre fin à l'anesthésie. Dès que les premiers mouvements respiratoires spontanés apparaissent, l'animal est désintubé.

3.2 Protocoles expérimentaux

7 jours après la chirurgie, les animaux sont anesthésiés une seconde fois avec un mélange de xylazine et kétamine (voir plus haut).

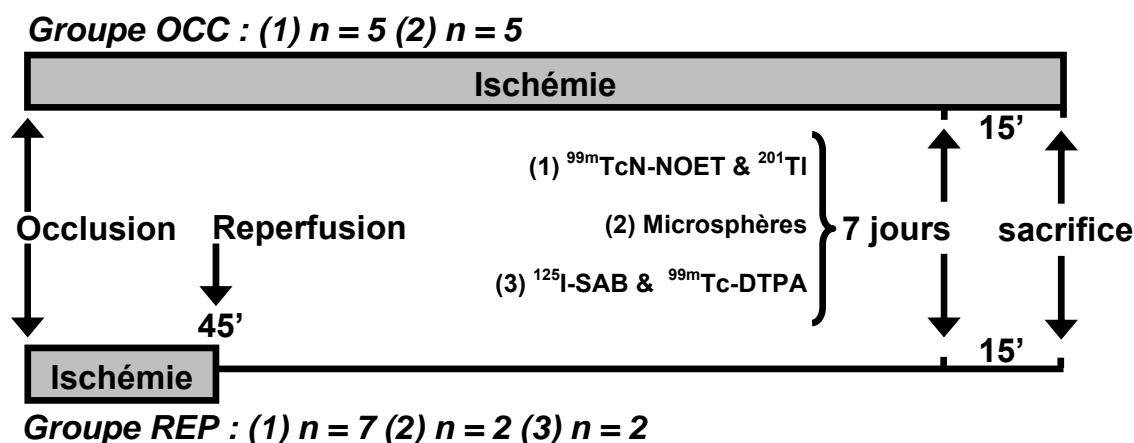


Figure 37. Protocoles expérimentaux.

a. $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et ^{201}Tl (1)

Les radiotraceurs $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (67 ± 8 Mbq) et ^{201}Tl (12 ± 1 MBq) sont injectés dans la veine saphène de 5 animaux du groupe OCC et 7 animaux du groupe REP. 15 minutes après ces injections, le cœur est rapidement prélevé, perfusé de manière antérograde par l'aorte avec

5 ml de sérum physiologique afin de rincer les artères coronaires, et placé 30 minutes au congélateur à -20°C pour les études post-mortem (Figure 37 (1)).

b. Débits sanguins myocardiques régionaux (2)

La technique des microsphères radioactives est utilisée pour déterminer les débits sanguins myocardiques régionaux chez 5 animaux du groupe OCC et 2 animaux du groupe REP (Figure 36 (2)). Un cathéter en polyéthylène PE 10 (diamètres externe : 0,61 mm et interne 0,28 mm) est placé dans une artère fémorale et un second cathéter PE 40 (diamètres externe : 0,96 mm et interne 0,58 mm) est introduit dans l'artère carotide droite. Ce second cathéter est relié à un transducteur de pression (Gould P23ID) qui permet de suivre la progression du cathéter lors de son insertion jusqu'au ventricule gauche (Figure 38).

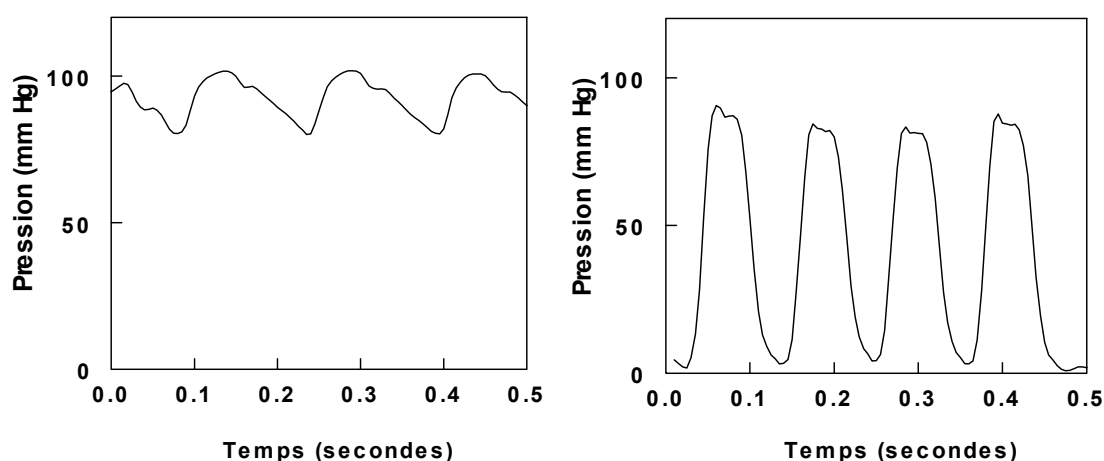


Figure 38. Tracés de pression enregistrés dans l'artère et dans le ventricule gauche utilisés pour l'injection des microsphères radioactives.

A gauche, le tracé de pression observé lorsque le cathéter se trouve dans l'artère carotide droite. La pression oscille entre 80 et 100 mm Hg environ. A droite, le tracé de pression observé lorsque le cathéter a atteint le ventricule gauche. La pression oscille entre 0 et 100 mm Hg environ.

Le cathéter PE 10 inséré dans l'artère fémorale est relié à une seringue de 2 ml placée sur une pompe réglée sur un débit de prélèvement de 0,5 ml par minute (Harvard Apparatus 11 plus pump). Cette pompe est mise en route, et 30 secondes après environ 300 000 microsphères radioactives marquées au ^{46}Sc sont injectées dans le ventricule gauche (NEN-TRACTM, PerkinElmer). 2 minutes après l'injection des microsphères, la pompe est arrêtée et l'activité du prélèvement sanguin est mesurée (Figure 39). 15 minutes après l'injection des

microsphères, le cœur est rapidement prélevé et placé 30 minutes au congélateur à -20°C pour les études *post-mortem*.

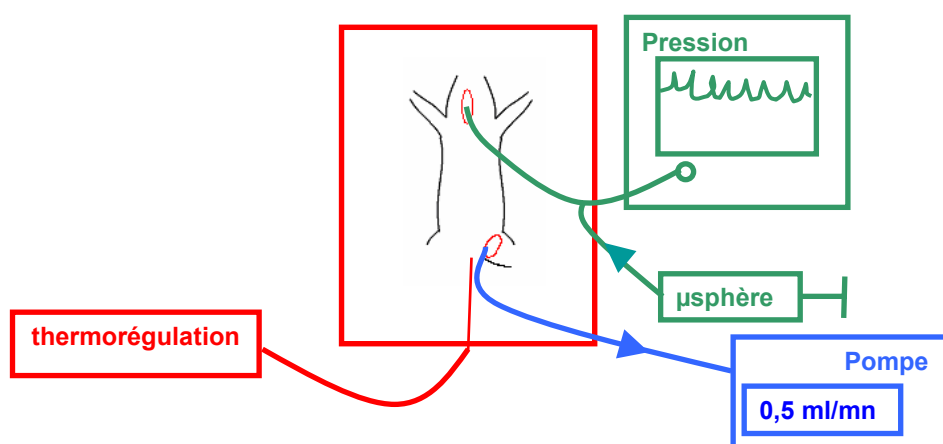


Figure 39. Injection des microsphères radioactives.

Le rat anesthésié est thermorégulé. Un cathéter est inséré dans l'artère carotide droite et le tracé de pression permet d'évaluer sa progression jusqu'au ventricule gauche. Les microsphères sont alors injectées dans le ventricule gauche par ce cathéter et un second cathéter positionné dans l'artère fémorale permet de prélever du sang à un débit connu afin d'établir une référence débit/activité.

c. $^{125}\text{I-SAB}$ et $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ (3)

Les radiotraceurs $^{125}\text{I-BSA}$ (19 MBq) et $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ (19 MBq) sont injectés dans la veine saphène de 2 animaux du groupe REP. Ils permettent de déterminer les volumes de distribution myocardique entre le sang et les tissus. Chez ces animaux, un prélèvement sanguin est réalisé dans la seconde veine saphène afin de déterminer l'hématocrite (Hema-C, Jouan) ainsi que les activités plasmatiques et cellulaires des deux radiotraceurs après centrifugation (2 min, 4000 RPM, 20°C). 15 minutes après les injections, le cœur est rapidement prélevé et placé 30 minutes au congélateur à -20°C pour les études *post-mortem*.

3.3 Analyses post-mortem

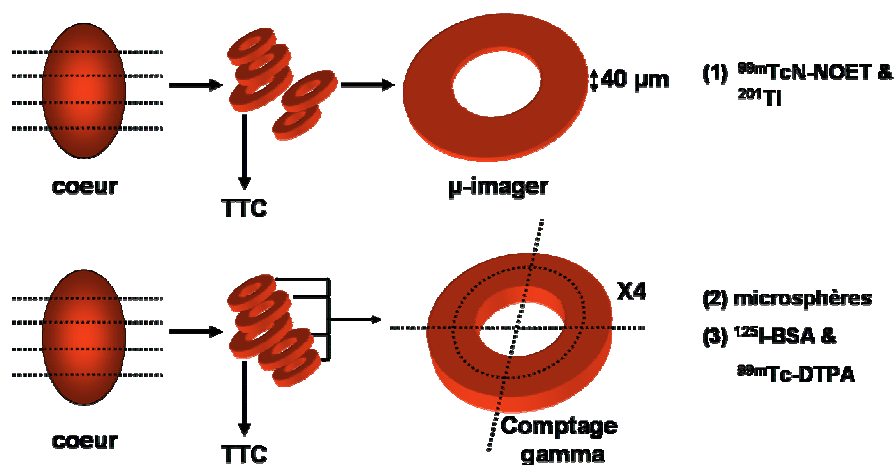


Figure 40. Analyses *post-mortem*.

a. Coloration au TTC

5 coupes « petit-axe » sont réalisées sur les cœurs solidifiés par la congélation. Le ventricule droit est disséqué afin de ne conserver que le ventricule gauche pour la suite des études. La troisième tranche, réalisée au milieu du ventricule gauche, est utilisée pour la détermination de la taille de la zone infarctée avec la coloration au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Figure 40).

La tranche de ventricule gauche est incubée pendant 10 minutes à 37°C dans une solution de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (2% dans du tampon phosphate PBS). La tranche est ensuite placée dans une solution de paraformaldéhyde 10% (PFA) durant 24 heures afin d'améliorer le contraste de la coloration au TTC. Les tissus viables, qui possèdent l'enzyme déshydrogénase, dégradent le TTC et apparaissent en rouge, tandis que les tissus nécrosés qui ont perdu cette enzyme ne sont pas colorés par le TTC et prennent une couleur blanche à l'issue de l'incubation dans le PFA. Les tranches sont photographiées à l'aide d'un appareil numérique, et un logiciel de traitement d'image (ImageJ) est utilisé pour déterminer les surfaces des zones viables et nécrosées. Le résultat est exprimé en % du ventricule gauche infarcté (% VG).

b. Imagerie double isotopes ex vivo et quantification de la surface et de l'amplitude des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl

Une tranche adjacente à celle utilisée pour la coloration au TTC est placée dans du milieu d'inclusion pour cryotome (Cryomount, HistoLab) puis remise à -20°C pour solidification. Sur la face adjacente à la tranche utilisée pour la coloration au TTC, une coupe de $40\ \mu\text{m}$ d'épaisseur est alors réalisée (cryotome Microm HM 505 E), puis déposée sur une lame pour microscope (Menzel-Glaser PolysineTM). Une acquisition de 12 heures avec un $\mu\text{-imager}^{\text{TM}}$ (Biospace) permet de réaliser l'imagerie simultanée de l'activité de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sur cette coupe de $40\ \mu\text{m}$. L'image brute obtenue représente la somme des électrons détectés, issus de la désintégration des deux isotopes utilisés. Sur la base des demi-vies respectives des deux isotopes utilisés (6,02 heures pour le ^{99m}Tc et 72 heures pour le ^{201}Tl), cette image est divisée en deux images représentant les activités en ^{99m}Tc et en ^{201}Tl (Figure 41).

Plus précisément, l'image correspond à l'acquisition réalisée entre 0 et 6 heures (Acq 1) contient une activité Tc1 en ^{99m}Tc et Tl1 en ^{201}Tl . L'image correspondant à l'acquisition réalisée entre 6 et 12 heures (Acq 2) contient une activité Tc2 en ^{99m}Tc , égale à la moitié de Tc1 puisque réalisée une demi-vie après Acq 1, et Tl2 en ^{201}Tl . En considérant que la décroissance du ^{201}Tl est négligeable entre Acq1 et Acq 2 et que Tl1 = Tl2 :

$$\begin{aligned} \text{Acq1} - \text{Acq2} &= (\text{Tc1} + \text{Tl1}) - (\text{Tc2} + \text{Tl2}) \\ \text{Acq1} - \text{Acq2} &= (2\text{Tc2} + \text{Tl1}) - (\text{Tc2} + \text{Tl1}) = \mathbf{Tc2} \end{aligned}$$

et :

$$\text{Acq 2} - \text{Tc 2} = \mathbf{Tl 2}$$

Des études préliminaires réalisées avec des dépôts d'activités connues en ^{99m}Tc et ^{201}Tl indiquent que la contamination relative entre les deux isotopes à l'issue de la séparation est inférieure à 5%.

La quantification de la surface et de l'amplitude du défaut de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl est réalisée à l'aide du logiciel associé au $\mu\text{-imager}$ ($\beta\text{vision+}$, Biospace). La surface est exprimée en pourcentage du ventricule gauche (% VG). L'amplitude correspond au rapport de l'activité du traceur (en coups/min/mm²) dans la zone infarctée par l'activité dans la zone saine.

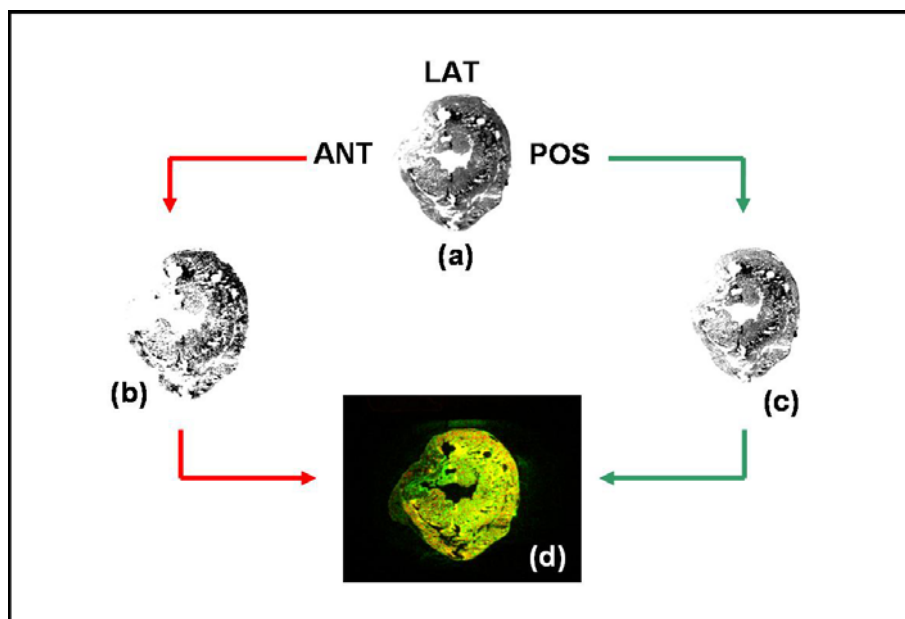


Figure 41. Détection double-isotopes.

L'image brute représente la somme des électrons détectés issus de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl (a). Sur la base des demi-vies respectives de ces isotopes, les images correspondant au $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (b) et au ^{201}Tl (c) sont obtenues séparément. L'utilisation d'une échelle de couleur propre à chaque isotope permet de refusionner ces deux images (d).

c. Détermination des débits sanguins myocardiques régionaux

Chacune des coupes « petit-axe » est divisée en 4 sections transmurales, et elles mêmes sont subdivisées en endocarde et en épicarde. Les fragments myocardiques obtenus ainsi que l'échantillon sanguin prélevé à l'aide de la pompe sont pesés et l'activité des microsphères est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Cobra II, Packard Instruments). Une fenêtre d'énergie située entre 842 et 1300 keV est utilisée pour la mesure de la radioactivité émise par les microsphères radiomarquées au scandium-46. Les comptages sont corrigés du bruit de fond. Les débits sanguins sont déterminés à l'aide de la technique des microsphères radioactives comme décrit précédemment (Chap I.B.6.1). Le débit est exprimé en ml/min/g.

d. Détermination des volumes de distribution fractionnels de ^{99m}Tc -DTPA et ^{125}I -SAB

Le cœur est découpé de la même manière que pour la détermination des débits sanguins myocardiques régionaux. La radioactivité contenue dans chacun d'eux est déterminée à l'aide du compteur à scintillation (Cobra II, Packard Instruments) avec les fenêtres d'énergie suivantes : ^{99m}Tc : 122 à 160 keV; ^{125}I : 15 à 75 keV. Les volumes fractionnels de distribution (VDF) de ^{99m}Tc -DTPA et ^{125}I -BSA sont déterminés dans la zone saine et dans la zone infarctée en utilisant les segments myocardiques prélevés au centre de ces deux régions (Arheden 1999). Le VDF de chacun des segments est calculé de la manière suivante :

$$\text{VDF} = (\text{activité myocardique} / \text{activité sanguine}) * (1 - \text{hématocrite})$$

e. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SYSTAT (SPSS). Un test *t* de student pour valeurs non appariées est utilisé pour les analyses inter-groupes, et un test ANOVA unidirectionnel est utilisé pour les analyses intra-groupes. Les résultats sont considérés comme étant statistiquement significatifs lorsque la valeur de *P* est inférieure à 0,05.

C. Résultats

1. Expérimentations *in vitro*

Les résultats des études réalisées *in vitro* afin de comparer les distributions de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl dans le sang humain total sont présentés sur la figure 42.

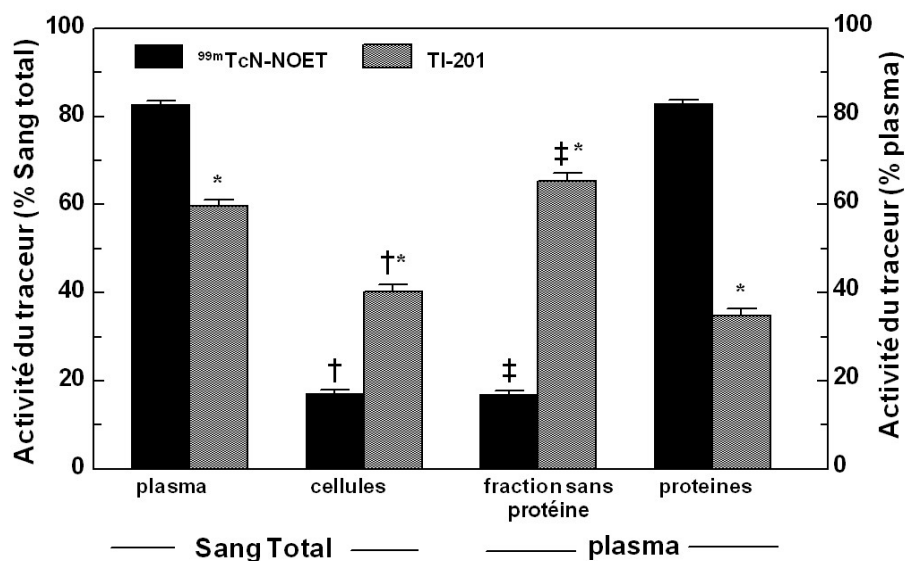


Figure 42. Etude *in vitro* de la distribution de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du Tl-201 dans le sang humain total.

La majorité du $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est associée aux protéines plasmatiques tandis que le ^{201}Tl s'équilibre entre les cellules et le plasma dans lequel il se lie très peu aux protéines. * $P < 0.001$ vs $^{99m}\text{TcN-NOET}$, † $P < 0.001$ vs plasma, ‡ $P < 0.001$ vs protéines.

Après incubation des traceurs dans le sang total et séparation des fractions sanguine et plasmatique par centrifugation, la mesure des activités de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl indiquent que les deux radiotraceurs sont principalement localisés dans le plasma. Cette localisation plasmatique est plus importante pour le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ que pour le ^{201}Tl ($82,8 \pm 0,7$ et $59,7 \pm 1,5$ % du sang total, respectivement, $P < 0,001$). A l'inverse, l'activité mesurée dans la fraction cellulaire est donc plus importante pour le ^{201}Tl que pour le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ($40,3 \pm 1,5$ et $17,2 \pm 0,7$ % du sang total, respectivement, $P < 0,001$).

Après incubation des traceurs dans le sang total, séparation des fractions cellulaire et plasmatique puis précipitation au TCA des protéines contenues dans la fraction plasmatique, l'activité de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ mesurée dans la phase plasmatique sans protéine ne représente

que $17,0 \pm 0,7$ % de l'activité plasmatique totale ($P < 0,001$ % en comparaison de la localisation protéique). En revanche, $65,3 \pm 1,8$ % de l'activité plasmatique du ^{201}Tl se trouve dans cette fraction sans protéine ($P < 0,001$ vs $^{99m}\text{TcN-NOET}$). L'activité plasmatique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est donc principalement retrouvée dans le précipité protéique ($83,0 \pm 0,7$ % vs $34,7 \pm 1,8$ % pour le ^{201}Tl , $P < 0,001$). La concentration moyenne en protéines plasmatiques, déterminée selon la méthode de Lowry, est de $70,0 \pm 1,3$ mg/ml.

2. Expérimentations *in vivo*

2.1 Surface des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl : comparaison avec la taille de l'infarctus

Un exemple de coloration au TTC est présenté sur la figure 43. La taille moyenne de la zone infarctée déterminée par la coloration au TTC, ainsi que les surfaces moyennes des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl , sont représentées sur les figures 44 et 45 respectivement.



Figure 43. Exemple de coloration au TTC réalisée sur une tranche de myocarde « petit-axe » d'un animal du groupe OCC.

Le myocarde viable apparaît coloré en rouge alors que le tissu infarcté, situé dans la région antérieure du ventricule gauche, apparaît en blanc.

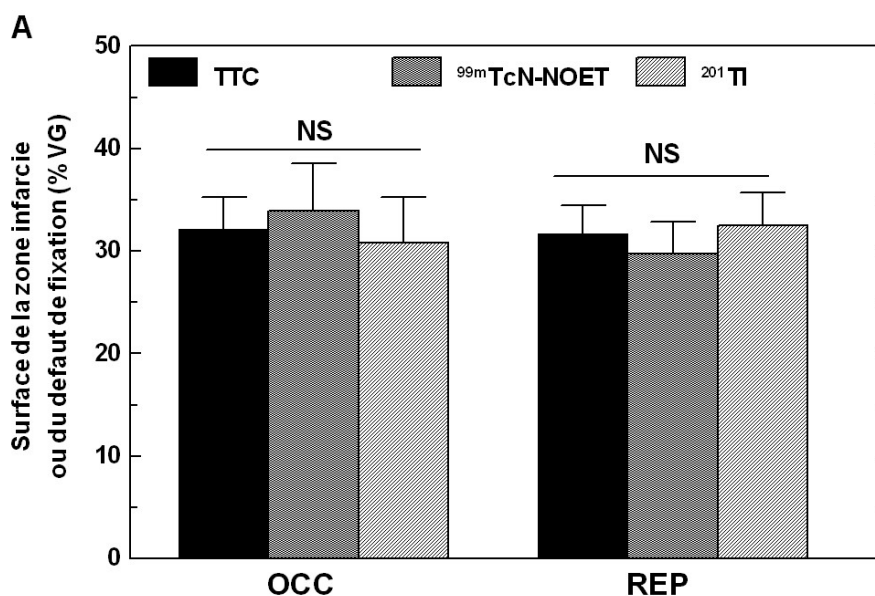


Figure 44. Comparaison de la surface de la zone infarctée déterminée par la coloration au TTC avec les surfaces des défauts de fixation en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et en ^{201}Tl .

Les résultats indiquent qu'il n'existe pas de différence significative entre la surface de la zone infarctée délimitée au TTC et les surfaces correspondant au défaut de fixation en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et en ^{201}Tl , et ceci aussi bien pour le groupe OCC ($32,2 \pm 3,1$ %VG, $33,9 \pm 4,7$ %VG, et $30,8 \pm 3,2$ %VG, respectivement, $P = \text{NS}$) que pour le groupe REP ($31,7 \pm 2,8$ %VG, $29,7 \pm 3,2$ %VG et $32,5 \pm 3,2$ %VG, respectivement, $P = \text{NS}$) (Figure 44).

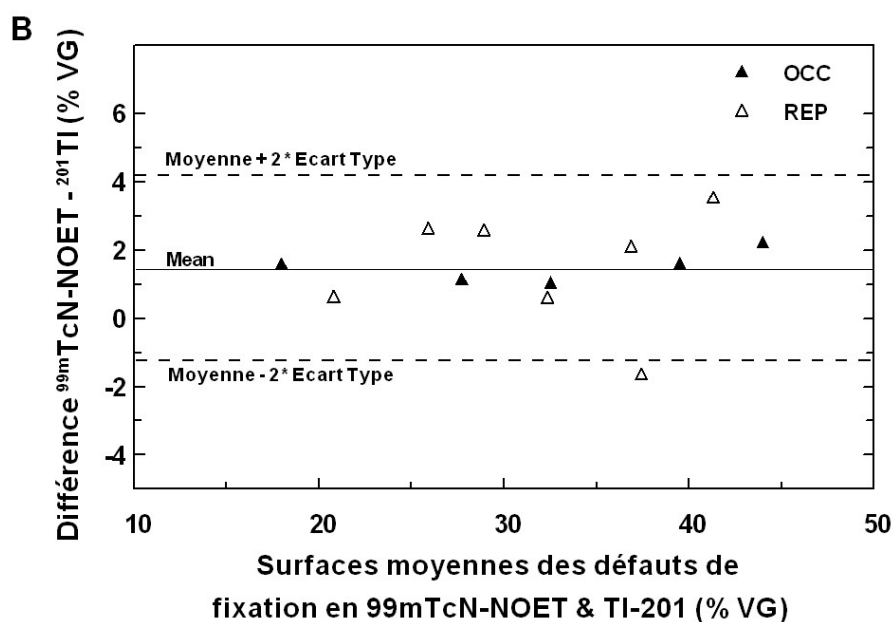


Figure 45. Analyse de Bland-Altman pour la comparaison des surfaces des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl .

D'autre part, une analyse de Bland-Altman (Figure 45) indique qu'il existe une excellente concordance entre les tailles des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl pour les animaux du groupe OCC comme pour les animaux du groupe REP.

2.2 Amplitude des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl : comparaison avec les débits sanguins myocardiques régionaux

Des images *ex vivo* obtenues à l'aide du phospho-imager et représentatives des résultats obtenus pour les groupes OCC et REP sont présentées sur la figure 46, et les résultats de la quantification sont représentés sur la figure 47.

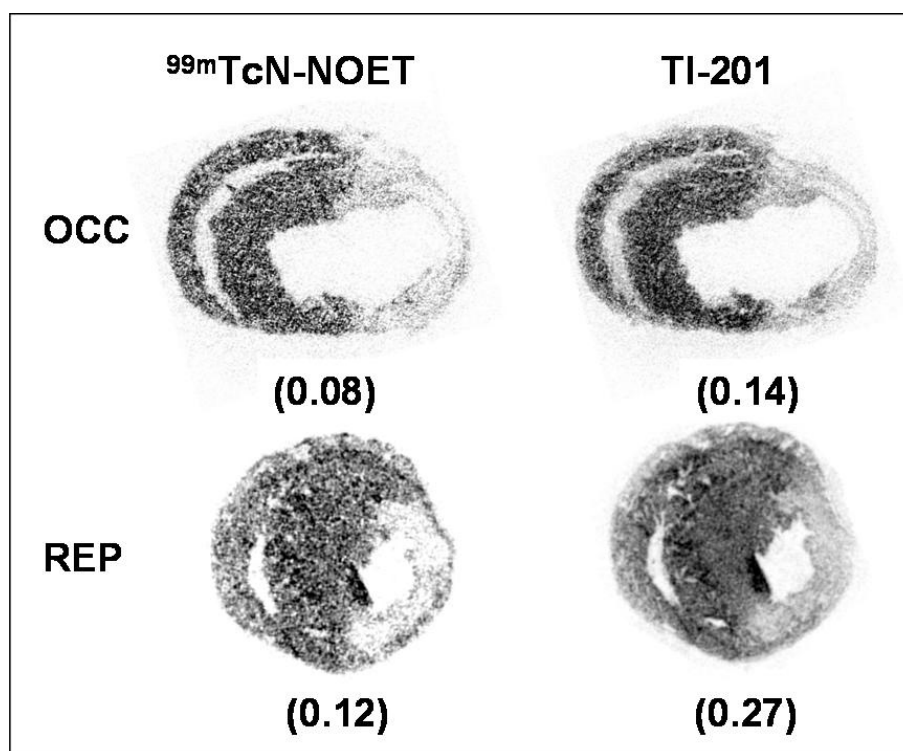


Figure 46. Images autoradiographiques de coupes « petit-axe » de myocarde représentatives de la fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ (gauche) et du ^{201}Tl (droite) pour un animal du groupe OCC (haut) et un animal du groupe REP (bas).

Un exemple est présenté pour les animaux sujets à une occlusion permanente de 7 jours de l'artère coronaire interventriculaire (groupe OCC, en haut) et pour les animaux sujets à une occlusion de 45 minutes reperfusée (groupe REP, en bas). L'amplitude du défaut de fixation de chaque traceur, déterminée par quantification *ex vivo*, est indiquée en dessous de chacune des images.

Dans le groupe OCC, le rapport des débits entre la zone ischémique et la zone saine vaut $0,06 \pm 0,01$. Les rapports des activités de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl entre les zones ischémique et saine sont significativement plus élevés ($0,11 \pm 0,01$ et $0,13 \pm 0,01$, respectivement, $P < 0,05$ comparativement au rapport des débits), ce qui indique que les deux traceurs sous-estiment l'amplitude de la réduction du débit de la même manière ($P = \text{NS}$ entre les deux traceurs).

Dans le groupe REP, le rapport des débits entre la zone ischémique et la zone saine vaut $0,17 \pm 0,01$ ($P < 0,05$ vs. OCC). Les rapports des activités de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre les zones ischémique et saine ($0,14 \pm 0,03$) n'est pas significativement différent de celui des débits, ni de ce même rapport déterminé pour le groupe OCC. Dans le groupe REP, le rapport des activités du ^{201}Tl entre les zones ischémique et saine ($0,25 \pm 0,02$) est significativement plus élevé que les rapports des débits ($P < 0,05$), des activités en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ($P < 0,05$), et du même rapport déterminé pour le groupe OCC ($P < 0,001$).

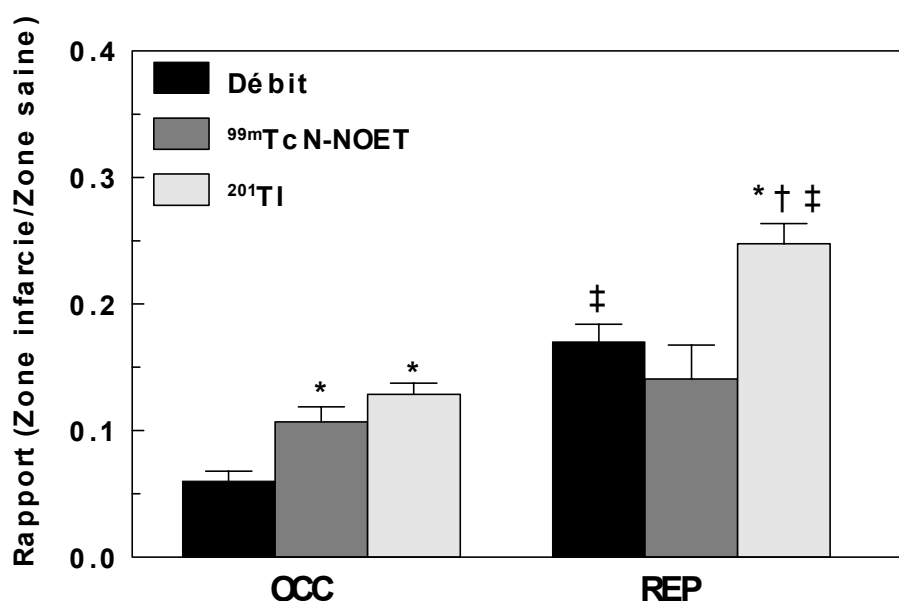


Figure 47. Amplitude de la diminution du débit et amplitudes des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl .

Les amplitudes ont été déterminées pour les animaux sujets à une occlusion coronaire permanente (groupe OCC) et pour les animaux sujets à une occlusion de 45 minutes reperfusée 7 jours (groupe REP). * $P < 0,05$ vs débit, † $P < 0,05$ vs $^{99m}\text{TcN-NOET}$, ‡ $P < 0,05$ vs OCC.

2.3 Volumes de distribution fractionnels de ^{99m}Tc -DTPA et ^{125}I -SAB dans le myocarde sain et reperfusé

Les résultats sont représentés sur la figure 48. Le VDF de ^{99m}Tc -DTPA dans le myocarde sain vaut $0,20 \pm 0,00$ et s'élève significativement à $0,38 \pm 0,04$ ($P < 0,05$) dans le myocarde infarcté. Le VDF de ^{125}I -SAB n'est pas significativement différent entre le myocarde sain et le myocarde ischémié ($0,08 \pm 0,01$ vs $0,11 \pm 0,01$, respectivement).

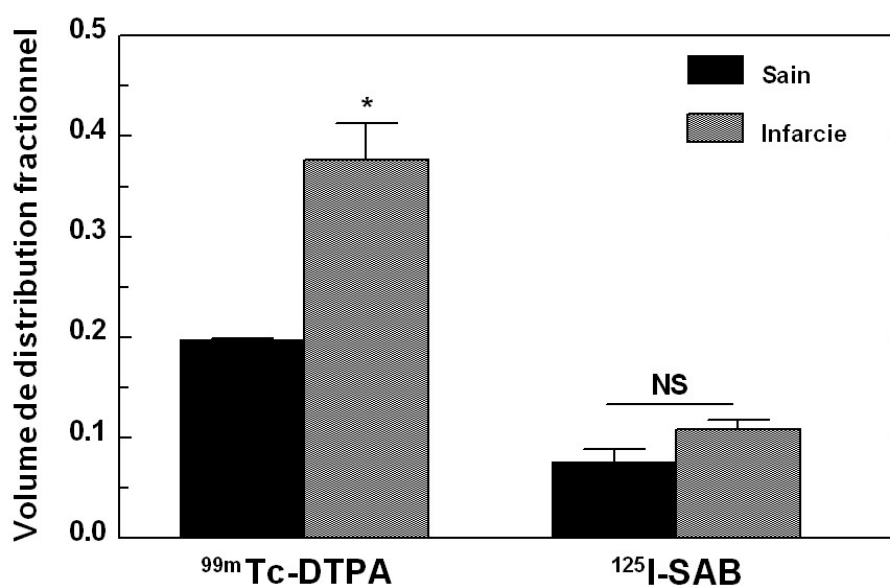


Figure 48. Volumes de distribution fractionnels (VDF) du ^{99m}Tc -DTPA, un traceur du liquide interstitiel, et de la ^{125}I -SAB, une protéine plasmatique.

Les VDF sont calculés dans le myocarde sain et dans le myocarde infarcté des animaux sujets à une occlusion coronaire de 45 minutes reperfusée (groupe REP). * $P < 0,05$ vs myocarde sain.

D. Discussion

Le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est un traceur de la perfusion myocardique. Une étude réalisée chez le chien sur un modèle aigu d'infarctus myocardique reperfusé indique que la captation de ce traceur, contrairement à celle du ^{201}Tl , est dépendante du débit sanguin myocardique plutôt que de la viabilité (Vanzetto 2000⁽²⁾). Sur ce modèle, le traceur est rapidement injecté après la reperfusion, à un temps auquel il existe toujours un débit sanguin résiduel dans la zone infarctée. En conséquence, la disparité qui existe entre le débit et la viabilité entraîne une disparité entre la répartition de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl .

Néanmoins, de très fortes corrélations ont été décrites entre le débit sanguin myocardique régional et la viabilité lors d'études réalisées chez le chien (Rivas 1976) et le cochon (Savage 1981) sur des modèles chroniques d'ischémie permanente. De plus, un phénomène de non-reperfusion (« no reflow ») (Kloner 1974, Reffelmann 2003) associé à une perte additionnelle significative de la perfusion régionale en corrélation avec la progression de la nécrose myocardique, ont été observés à la suite de la restauration initiale du débit sanguin sur des modèles expérimentaux d'infarctus myocardiques reperfusés (Ambrosio 1989, Matsumura 1998, Rochitte 1998). Ainsi, la reperfusion est suivie d'une phase précoce aiguë durant laquelle le débit n'est pas corrélé à la viabilité, mais aux temps tardifs, les débits sanguins myocardiques régionaux sont corrélés à la viabilité myocardique.

En conséquence, le comportement de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, traceur pur du débit sanguin, devrait être identique à celui du ^{201}Tl , traceur de la viabilité myocardique, lorsque ces traceurs sont administrés après la phase aiguë sur des modèles chroniques d'ischémie non reperfusée et reperfusée. Cette hypothèse fait l'objet de la présente étude.

Une nouvelle méthode de détection autoradiographique simultanée du ^{99m}Tc et du ^{201}Tl à l'aide du μ -imagerTM haute résolution de Biospace a été développée. Elle permet de réaliser l'imagerie autoradiographique *ex-vivo* de la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl dans des coupes « petit-axe » de 40 μm d'épaisseur de myocarde de rat présentant un infarctus du myocarde. Cette séparation, réalisée sur la base des demi-vies respectives des deux isotopes avec une très faible contamination de chacun des isotopes dans l'image de l'autre, permet de comparer les images autoradiographiques de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl chez un même animal avec une très bonne précision.

Chez les animaux sujets à une occlusion chronique de l'artère coronaire interventriculaire (groupe OCC), les surfaces des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sont similaires et ne diffèrent pas significativement de la surface de la zone infarctée déterminée à l'aide de la coloration au TTC. La comparaison du rapport des débits entre la zone ischémique et la zone saine avec les rapports de fixation des deux traceurs entre ces mêmes zones indique que le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et le ^{201}Tl sous-estiment tous deux de manière significative l'amplitude de la réduction de débit dans le tissu infarcté. Ce phénomène a été décrit précédemment pour $^{99m}\text{TcN-NOET}$ comme pour le ^{201}Tl (Calnon 1999), ainsi que pour d'autres traceurs de la perfusion myocardique (Glover 1995, Glover 1995⁽²⁾, Glover 1997). Il est généralement attribué à un meilleur coefficient d'extraction des traceurs dans les bas débits. En conclusion, sur notre modèle chronique d'occlusion coronarienne non reperfusée, le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et le ^{201}Tl se comportent donc de manière identique en terme de surface et d'amplitude du défaut de fixation.

Chez les animaux sujets à une occlusion coronaire de 45 minutes suivie d'une reperfusion de 7 jours (groupe REP), les surfaces des défauts de fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl sont également similaires. De même que pour le groupe OCC, ces surfaces ne diffèrent pas significativement de la surface de la zone infarctée déterminée à l'aide de la coloration au TTC. Le fait que la taille de la zone infarctée soit identique entre les groupes OCC et REP est en accord avec les résultats obtenus lors d'une étude réalisée par Boyle et Weisman (Boyle 1993). Dans cette étude, les auteurs montrent que suite à une occlusion coronaire d'une heure, la reperfusion permet de limiter l'expansion de l'infarctus, mais qu'elle ne diminue pas sa taille à 7 jours après la reperfusion en comparaison des résultats obtenus dans le groupe d'animaux contrôles soumis à une occlusion coronaire permanente. Dans notre étude, chez les animaux du groupe REP, le rapport des débits entre la zone ischémique et la zone saine indique que malgré la reperfusion, le débit est nettement diminué dans la zone ischémique puisqu'il représente moins de 20% du débit observé dans la zone saine. Ces résultats sont en accord avec une étude récente de Reffelmann et al., selon laquelle le phénomène de non-reperfusion persiste au-delà de 4 semaines de reperfusion sur un modèle d'ischémie reperfusée chez le rat (Reffelmann 2003). Le fait que le rapport des débits entre la zone ischémique et la zone saine soit plus élevé dans le groupe REP que dans le groupe OCC est en accord avec les résultats publiés par Rochitte et al. (Rochitte 1998). Comme l'indique la figure 46, le rapport entre l'activité de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ dans la zone infarctée et l'activité dans la zone saine est identique au rapport des débits entre ces mêmes zones et n'est pas significativement différent de ce même rapport d'activité déterminé pour le groupe OCC.

Selon Vanzetto et al., lorsqu'il est administré en phase aigue d'infarctus reperfusé chez le chien, phase caractérisée par une absence de corrélation entre le débit et la viabilité myocardique, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est un traceur des débits sanguins myocardiques mais pas de la viabilité (Vanzetto 2000⁽²⁾). Néanmoins, à la suite de la restauration initiale du flux sanguin dans le territoire précédemment ischémique, une diminution progressive de la perfusion est observée au sein de la zone infarctée à l'issue de laquelle le débit sanguin est corrélé à la perfusion myocardique (Kloner 1974, Ambrosio 1989, Matsumura 1998, Rochitte 1998). Les résultats de la présente étude indiquent qu'un traceur de la perfusion myocardique tel que $^{99m}\text{TcN-NOET}$ peut également être utilisé aux temps longs afin d'apprécier la viabilité myocardique dans un modèle d'infarctus reperfusé.

Les résultats obtenus avec le ^{201}Tl dans le groupe REP indiquent que pour ce traceur, le rapport entre l'activité dans la zone infarctée et l'activité dans la zone saine est significativement plus élevé que le rapport des débits et que le rapport des activités de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre ces mêmes régions. Ce rapport des activités du ^{201}Tl est également significativement augmenté en comparaison du même rapport déterminé dans le groupe OCC. Cette augmentation ne peut pas être attribuée à la présence de viabilité myocardique puisque la région présentant un défaut de fixation en $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et en ^{201}Tl n'est pas colorée par le TTC et que le débit sanguin dans cette région TTC-négative est inférieur à 20 % du débit normal.

Une captation myocardique significative du ^{201}Tl dans la région non-viable aux temps précoces suivant la restauration du flux sanguin a été décrite par Melin et al. (Melin 1993) et par Forman et al. (Forman 1984). En conséquence, ces auteurs ont fait l'hypothèse que la captation myocardique du ^{201}Tl n'est pas entièrement due à un processus actif.

A la suite de leur injection intraveineuse, les traceurs de la perfusion tels que le $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ou le ^{201}Tl se répartissent dans le compartiment sanguin d'où ils sont extraits par le myocarde proportionnellement au débit sanguin myocardique. Le sang étant le premier compartiment biologique que rencontre ces traceurs, leurs distributions sanguines respectives est un déterminant essentiel des mécanismes par lesquels ils sont extraits ou retenus par le myocarde. Cependant, bien que des interactions de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ avec les globules blancs ou avec l'albumine aient été mises en évidence lorsque ces éléments sont isolés et incubés en présence du traceur, il n'existe pas à ce jour d'étude comparant la distribution sanguine globale de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl lorsqu'ils sont incubés dans le sang humain total (Johnson 1997, Demaimay 1997, Riou 2003).

Les résultats obtenus *in vitro* dans la présente étude indiquent qu'à la suite de son incubation dans le sang humain total, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est lié de façon prédominante aux protéines plasmatiques. Cette localisation s'explique principalement par le caractère lipophile de ce traceur (Pasqualini 1994) et par la forte concentration des protéines plasmiques (70 mg/ml) qui offre une abondance de sites de liaison non spécifiques. En revanche, lorsqu'il est incubé dans le sang total, le ^{201}Tl se distribue à 60 % dans la fraction plasmique et à 40 % dans la fraction cellulaire. De plus, dans le plasma, le ^{201}Tl n'est pas lié aux protéines plasmatiques. Cette différence entre les distributions sanguines de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ et du ^{201}Tl permet d'émettre une hypothèse concernant l'augmentation significative de l'activité du ^{201}Tl dans la région infarctée reperfusée des animaux du groupe REP. Walen et al., et plus récemment Inoue et al., ont montré qu'un œdème significatif se forme dans le myocarde infarcté reperfusé mais qu'il est absent du myocarde infarcté non reperfusé résultant d'une occlusion coronarique permanente (Whalen 1974, Inoue 1999). En accord avec les résultats obtenus par Arheden et al., les résultats de la présente étude indiquent que le volume de distribution fractionnel du $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, un traceur du liquide interstitiel, vaut 0,2 dans le myocarde sain (Arheden 1999). Nous avons également observé que cette valeur était significativement augmentée dans le myocarde infarcté reperfusé, ce qui indique qu'un œdème se forme dans cette région dans nos conditions expérimentales. De plus, les résultats obtenus lors des expérimentations réalisées avec la $^{125}\text{I-SAB}$ indiquent que cette protéine plasmique majeure ne se retrouve pas en forte proportion dans le myocarde infarcté reperfusé en comparaison du myocarde sain. Les expérimentations réalisées *in vitro* sur sang humain total indiquent que, contrairement au $^{99m}\text{TcN-NOET}$, le ^{201}Tl n'est pas associé aux protéines plasmatiques. L'œdème mis en évidence avec le $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ pourrait donc permettre la diffusion du ^{201}Tl plasmique vers la région infarctée reperfusée. En revanche, l'absence de diffusion des protéines sanguines du compartiment intravasculaire vers l'œdème ainsi que l'indiquent les expérimentations réalisées avec la $^{125}\text{I-SAB}$, expliquerait l'absence d'une élévation du rapport des activités de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ entre la zone infarctée et la zone saine des animaux du groupe REP.

E. Conclusions et implications cliniques

Chez les patients concernés par une angioplastie coronaire primaire dans le cadre de la prise en charge d'un infarctus du myocarde aigu, il a été mis en évidence que la présence du phénomène de non-reperfusion (correspondant à une valeur de l'index « Thrombolysis In Myocardial Infarction » (TIMI) < 3) lors de l'angiographie coronaire est un bon indicateur prédictif d'un futur événement cardiaque majeur ou d'un événement cardiaque mortel (Morishima 2000). De plus, des études cliniques réalisées entre 7 et 10 jours après une thérapie de reperfusion en IRM de contraste ou en échocardiographie doppler transthoracique, ont permis de mettre en évidence que la présence d'obstructions microvasculaires était associée à une plus faible récupération cardiaque (Wu 1998, Shintani 2004). Un outil diagnostique simple et largement disponible permettant d'apprécier rapidement et précisément la reperfusion myocardique serait donc d'un intérêt pronostique majeur pour les patients. Les résultats obtenus lors de la présente étude indiquent que la captation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, évaluée 7 jours après la reperfusion d'un infarctus du myocarde, reflète plus justement le débit sanguin résiduel dans la zone infarctée que le ^{201}Tl . En conséquence, l'imagerie nucléaire avec un traceur pur du débit sanguin tel que $^{99m}\text{TcN-NOET}$ pourrait apporter une information diagnostique et pronostique précieuse chez des patients concernés par une thérapie thrombolytique et/ou une angioplastie coronaire lors d'un infarctus aigu du myocarde.

La captation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$, un traceur pur du débit sanguin coronaire, délimite la région non-viable lors des expérimentations réalisées sur des modèles chroniques d'ischémie myocardique non reperfusée et reperfusée. La diminution significative de l'amplitude du défaut de fixation du ^{201}Tl observée dans le myocarde infarcté des animaux sujets à une ischémie myocardique reperfusée est probablement due à la diffusion partielle de ce traceur du plasma vers l'œdème qui se forme dans cette région infarctée. Comme la captation du $^{99m}\text{TcN-NOET}$ reflète mieux les débits sanguins myocardiques régionaux que le ^{201}Tl , ce traceur pourrait constituer un outil diagnostique efficace pour l'évaluation clinique de l'obstruction microvasculaire chez des patients concernés par une thérapie de reperfusion à la suite d'un infarctus du myocarde.

III. Conclusion générale

La première étude indique que, contrairement aux résultats obtenus *in vitro* par Riou et al. (1998) sur des cardiomyocytes en culture, le vérapamil n'inhibe pas la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* chez le chien. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une fixation non spécifique de ce traceur (Johnson 1998, Riou 1999, Riou 2000). En effet, l'absence d'effet du vérapamil s'explique probablement par une fixation de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ aux cellules endothéliales qui ne possèdent pas de canaux calciques de type L. $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est donc un traceur pur du débit de perfusion et son extraction myocardique n'est dépendante que de ce paramètre. En conséquence, dans le cadre d'un infarctus du myocarde reperfusé :

- A la phase aiguë : Le territoire infarci est encore perfusé. $^{99m}\text{TcN-NOET}$ se fixe donc dans le territoire infarci proportionnellement au débit de perfusion (Vanzetto 2000⁽²⁾).
- Lors d'un infarctus chronique : Le territoire infarci n'est plus perfusé, c'est le phénomène de non-reperfusion ou « no-reflow » (Kloner 1974, Reffelmann 2003). En conséquence, et ainsi que l'indiquent les résultats obtenus lors de la seconde étude réalisée sur un modèle d'infarctus chronique chez le rat, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ ne se fixe pas dans le territoire infarci.

En conclusion, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ est un traceur pur du débit de perfusion myocardique. Au-delà de la phase aiguë de la reperfusion, le débit régional étant corrélé à la viabilité tissulaire, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ peut donc être envisagé comme un traceur de la viabilité dans cette situation.

Partie II :

Revue

Bibliographique

**Evaluation de nouveaux radiotraceurs
de la plaque d'athérome vulnérable**

I. Introduction

L'athérosclérose est une pathologie de la paroi artérielle qui se développe au niveau de sites privilégiés dans l'ensemble de l'arbre artériel dès le stade fœtal et évolue ensuite lentement durant plusieurs décennies pour ne devenir généralement symptomatique qu'à la fin de l'âge adulte (Napoli 1997). Ainsi, dans les pays industrialisés, la plupart des individus adultes vivent avec des lésions athérosclérotiques coronaires asymptomatiques. Or les complications de cette pathologie constituent la première cause de mortalité dans ces sociétés (OMS 2003). Le diagnostic et le traitement des individus à risque au sein de ces populations constituent donc des enjeux cliniques majeurs. La principale complication de l'athérosclérose est la cardiopathie ischémique due à l'athérosclérose des artères coronaires. Durant la dernière décennie, de nombreuses études ont considérablement bouleversé nos connaissances de la physiopathologie de l'athérosclérose (Ross 1999, Fuster 1999). L'utilisation de modèles animaux transgéniques a notamment permis de découvrir de nombreuses molécules athérogéniques ou antiathérogéniques. Ces avancées ont permis d'identifier de nombreux facteurs de risque ainsi que des cibles potentielles pour le diagnostic comme pour le traitement de l'athérosclérose (Glass 2001). Ainsi, longtemps considérée comme une accumulation progressive et sténosante de lipides dans la paroi artérielle, l'athérosclérose est à présent considérée comme une pathologie inflammatoire chronique au sein de laquelle on distingue, en fonction de leur métabolisme et de leur composition, différents types de plaques d'athérome (Stary 1995). Les plaques sujettes à la rupture, et dont le développement n'est pas nécessairement obstructif, sont responsables de la majorité des événements coronariens aigus (De Franco 2001). Ce sont donc ces plaques, dites « plaques vulnérables », qui constituent actuellement la première cible pour le diagnostic comme pour la thérapie de l'athérosclérose (Naghavi 2003). La plaque d'athérome vulnérable est caractérisée par d'importants phénomènes inflammatoires et par une large plage lipidique et nécrotique (>40% de son volume) recouverte d'une fine capsule fibreuse (<100 µm). De nombreuses modalités d'imagerie, invasives ou non, sont actuellement à l'étude pour le diagnostic de la plaque vulnérable. Parmi elles, la médecine nucléaire, technique très sensible d'imagerie fonctionnelle, pourrait apporter sa spécificité. La présente étude a pour but l'évaluation de nouveaux radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable utilisables en médecine nucléaire. La cible choisie est la Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), impliquée dans les phénomènes inflammatoires au sein de la plaque d'athérome vulnérable. Les ligands évalués

sont des motifs peptidiques issus d'une molécule du CMH-1 et décrits pour lier VCAM-1 *in vitro* et *in vivo* (Ling 2000).

II. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), les pathologies cardiovasculaires sont responsables de 16,7 millions de décès par an soit un tiers des décès dans le monde (OMS 2003) (Tableau 1).

Mortalité chez les adultes de 15 à 59 ans			Mortalité chez les adultes de + de 59 ans		
Rang	Cause	Décès (10 ³)	Rang	Cause	Décès (10 ³)
1	VIH/SIDA	2279	1	Cardiopathies ischémiques	5823
2	Cardiopathies ischémiques	1332	2	Accidents vasculaires-cérébraux	4689
3	Tuberculose	1036	3	Pneumopathie chronique obstructive	2399
4	Accidents de la circulation	814	4	Infections respiratoires basses	1396
5	Accidents vasculaires-cérébraux	783	5	Cancer trachée, bronches, poumons	928
6	Lésions auto-infligées	672	6	Diabète sucré	754
7	Actes de violence	473	7	Cardiopathie hypertensive	735
8	Cirrhose du foie	382	8	Cancer de l'estomac	605
9	Infections respiratoires basses	352	9	Tuberculose	495
10	Pneumopathie chronique obstructive	343	10	Cancer du colon ou du rectum	477

Tableau 1. Principales causes de mortalité dans le monde chez les adultes en 2002.

Rapport de l'OMS, 2003.

Ces pathologies cardiovasculaires regroupent les atteintes coronariennes, les pathologies cérébrovasculaires, les congestions, l'hypertension, les maladies des artères, le rhumatisme cardiaque et les pathologies congénitales (Figure 1). Ces pathologies sont graves et nécessitent généralement un traitement chronique, ce qui implique un coût élevé pour leur prise en charge. Parmi ces pathologies cardiovasculaires, l'ischémie cardiaque est responsable de la majorité des décès, suivie des pathologies cérébrovasculaires. Ainsi, aux Etats-Unis, d'après le centre de surveillance des pathologies cardiovasculaires pour l'OMS, les pathologies cardiovasculaires sont responsables de 41% des décès et pour plus de la moitié des cas il s'agit d'atteintes coronariennes. Diagnostiquer et traiter les plaques d'athérome responsables de ces atteintes coronariennes constituent donc des enjeux cliniques majeurs.

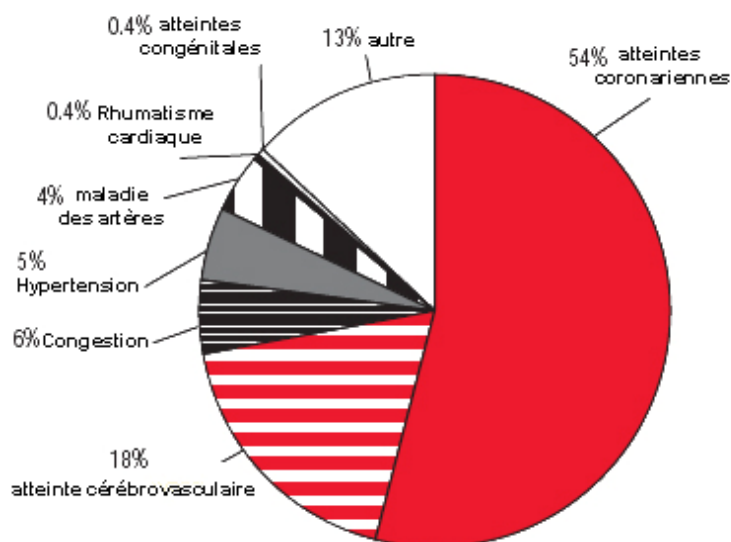


Figure 1. Détail des décès liés aux pathologies cardiovasculaires aux Etats-Unis en 2001 (AHA 2004).

III. Physiopathologie de la plaque d'athérome

La plaque d'athérome est une pathologie inflammatoire chronique de la paroi artérielle.

A. Rappels sur la structure de l'artère

Cette paroi est constituée de trois parties distinctes (Figure 2).

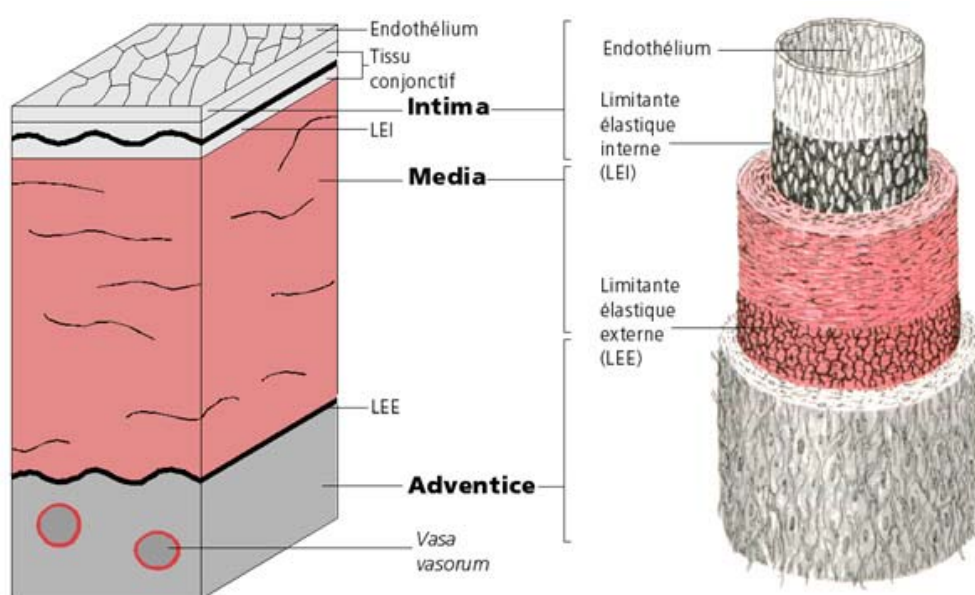


Figure 2. Structure d'une artère (Steven 1997).

1. L'intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales formant une couverture étanche. Cet endothélium exerce différentes fonctions régulatrices telles que la synthèse de molécules vasoactives (NO, endothéline), la thromborésistance (synthèse de prostaglandine I₂, antithrombine III, activateur tissulaire du plasminogène) ou la régulation des phénomènes immunitaires. Le sous-endothélium est formé de tissu conjonctif essentiellement constitué de fibres de collagène. C'est à son niveau que se forme la plaque d'athérome. La limitante élastique interne, une lame de fibres élastiques constituées d'élastine, sépare l'intima de la média.

2. La media

C'est la tunique moyenne et la plus épaisse des trois. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses, empilées de façon concentrique en couches appelées « unités lamellaires ». Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère : d'une couche pour les artérioles, à plusieurs couches pour les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice extra-cellulaire constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides. Dans sa partie externe, la média reçoit l'irrigation des *vasa vasorum* de l'adventice. La limitante élastique externe, une lame d'élastine, sépare la media de l'adventice.

3. L'adventice

C'est la tunique externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Elle assure l'ancrage de l'artère aux structures avoisinantes. Un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoint les fibres musculaires lisses de la media. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui se prolongent dans la partie externe de la media (Leoni 2001).

Selon leurs calibres, on distingue les artérioles, uniquement constituées d'un endothélium et d'une limitante élastique interne, puis les petites et moyennes artères de type musculaire et enfin les grandes artères de type élastique, riches en élastine.

B. Les évènements initiaux au développement de l'athérosclérose

1. La dysfonction endothéliale

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique (Ross 1999). Elle se développe de manière diffuse dans l'ensemble des grosses artères à des sites privilégiés. En effet, les lésions athérosclérotiques apparaissent principalement au niveau des bifurcations artérielles, sur la paroi opposée au point de jonction (Figure 3) (Ku 1985).

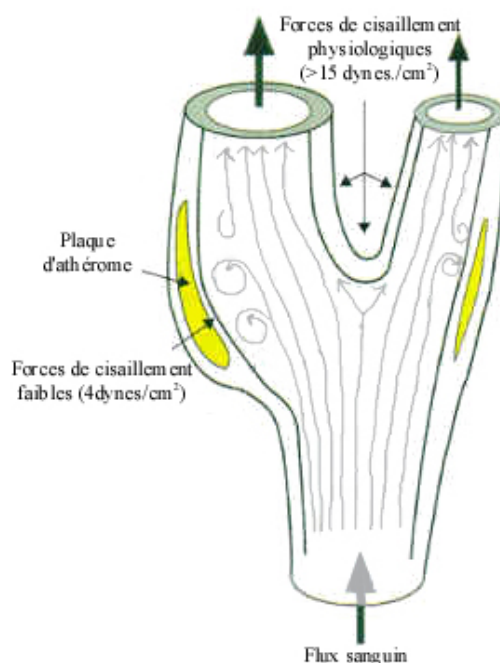


Figure 3. La diminution des forces de cisaillement est corrélée au développement des plaques d'athérome (Malek 1999).

A ce niveau, les forces de cisaillement très basses et oscillantes (± 4 dynes/cm²) sont responsables de nombreuses modifications dans l'expression génique, le métabolisme et la morphologie des cellules endothéliales. Ainsi, dans ces zones de prédisposition à l'athérosclérose, il a été mis en évidence une augmentation de la prolifération et de l'apoptose des cellules endothéliales, une diminution de la production de facteurs vasodilatateurs, d'enzymes anti-oxydantes, d'inhibiteurs de croissance et de facteurs fibrinolytiques. Parallèlement, on constate une augmentation de la production de facteurs vasoconstricteurs, des activateurs de croissance et des facteurs thrombotiques (Malek 1999) (Tableau 2). La principale modification est sans doute la diminution de la production d'oxyde nitrique (NO) qui conduit à une vasoconstriction, ainsi qu'à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B

responsable de l'activation de nombreux gènes proinflammatoires. Le NF-κB induit notamment l'expression de la P-sélectine et de VCAM-1, deux molécules d'adhésion impliquées dans l'athérogénèse (Kinley 2001).

	Forces de cisaillement physiologiques ($> 15 \text{ dynes/cm}^2$)	Forces de cisaillement faibles ($\pm 4 \text{ dynes/cm}^2$)
Morphologie	Fusiformes et allongées	Polygonales et non alignées
Synthèse protéique:		
Fonctions vasoactives :		
Vasoconstriction	-	+
Vasodilatation	+	-
Enzymes anti-oxidantes	+	-
Facteurs de croissance :		
activateurs	-	+
inhibiteurs	+	-
Cytokines inflammatoires	-	+
Molécules d'adhésion	-	+
Facteurs prothrombotiques	-	+
Facteurs fibrinolytiques	+	-
Prolifération	-	+
Apoptose	-	+

Tableau 2. Modifications des cellules endothéliales en réponse à des forces de cisaillement faibles sur l'endothélium (Malek 1999).

Les forces de cisaillement faibles et oscillantes sont donc responsables de dysfonctions endothéliales qui prédisposent l'endothélium à l'inflammation en augmentant sa perméabilité ainsi que le recrutement et l'adhérence des leucocytes circulants.

2. Le rôle des lipoprotéines de basse densité dans l'athérosclérose

Parmi les nombreux facteurs de risque génétiques et environnementaux impliqués dans l'athérosclérose, l'élévation du taux de cholestérol est le seul à pouvoir induire le développement de la plaque, même en l'absence de cofacteurs (Glass 2001). La compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent la synthèse et les taux plasmatiques de cholestérol a permis le développement d'une classe de médicaments hypocholestérolémians, les statines (Goldstein 1977). Elles réduisent significativement les risques de mortalité liés aux pathologies cardiovasculaires chez des patients

hypercholestérolémiques, confirmant ainsi le rôle prépondérant du cholestérol (Gould 1998). Dans le plasma, le cholestérol est transporté par différentes lipoprotéines. Ce sont les lipoprotéines de basse densité ou Low Density Lipoproteins (LDL) qui sont responsables sous leur forme oxydée de l'initiation de l'inflammation. Ce phénomène est favorisé dans les zones de dysfonction endothéliale induites par les forces de cisaillement faibles et oscillantes (Morel 1983, Griendling 1997, Navab 2002).

2.1 Rappel sur les lipoprotéines

a. Rôle des lipoprotéines

Par définition, les lipides sont insolubles dans l'eau. Afin de transporter dans le plasma les acides gras, le cholestérol, les phospholipides, les triacylglycérols, les stéroïdes ou certaines vitamines, des protéines de transport sont nécessaires. La majeure partie des lipides est transportée par d'importants complexes appelés lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont constituées d'un cœur hydrophobe entouré par une couronne de phospholipides, cholestérol et protéines (Figure 4). Ces protéines sont des apoprotéines. Elles solubilisent les lipides hydrophobes et jouent un rôle majeur dans le ciblage cellulaire et le métabolisme des lipoprotéines. On classe les lipoprotéines en fonction de leur densité. Des moins denses aux plus denses, on distingue : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (Very Low Density Lipoproteins : VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (Intermediate Density Lipoproteins : IDL), les lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoproteins : LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL : High Density Lipoproteins). Des transferts de lipides ou d'apoprotéines sont possibles entre les différentes lipoprotéines.

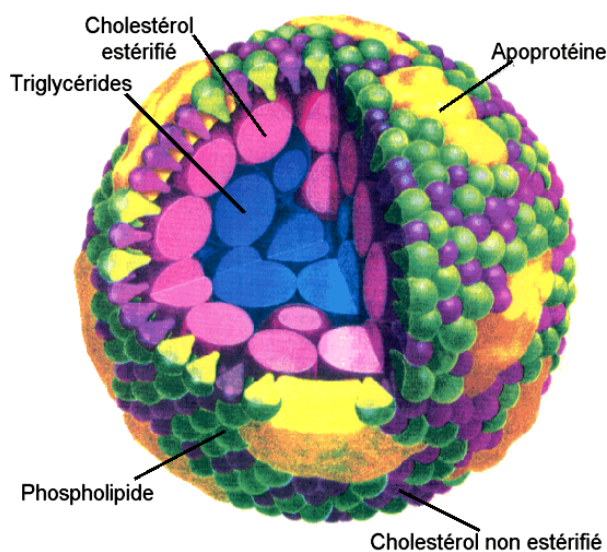


Figure 4. Structure d'une lipoprotéine (HDL).

b. Métabolisme des lipoprotéines

Les chylomicrons transportent les lipides d'origine alimentaire, alors que les VLDL, IDL, LDL et HDL transportent les lipides endogènes. Les VLDL sont synthétisées par le foie, elles possèdent les apoprotéines E et B100. Elles ont pour fonction de transporter les triglycérides vers les tissus périphériques qui les hydrolysent en acides gras sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL). Ces acides gras sont utilisés comme source d'énergie ou stockés sous forme de triglycérides. Les VLDL appauvries évoluent en IDL qui à leur tour, si elles ne sont pas réabsorbées au niveau du foie, peuvent perdre l'apo-E et sous l'action de la LPL évoluer en LDL. Les LDL sont donc des lipoprotéines très riches en cholestérol et possèdent l'apo-B100. Chez l'homme, la majorité du cholestérol plasmatique est transporté par les LDL dont le rôle principal est le transport du cholestérol vers les tissus périphériques. L'élévation du taux de cholestérol plasmatique étant associé à une augmentation des risques cardiovasculaires, les LDL sont couramment nommées « mauvais cholestérol » (Morel 1983, Griendling 1997). A l'inverse, les HDL, couramment nommées « bon cholestérol » et secrétées par le foie et les cellules intestinales, transportent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Pour ce faire, les HDL contiennent notamment deux enzymes, la Lechitin-Cholesterol Tranferase (LCAT) qui estérifie le cholestérol, et la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), qui permet le transfert du cholestérol estérifié vers la HDL. La HDL s'enrichit en cholestérol et acquiert l'apo-E qui lui permet d'être absorbée et métabolisée par le foie (Figure 5).

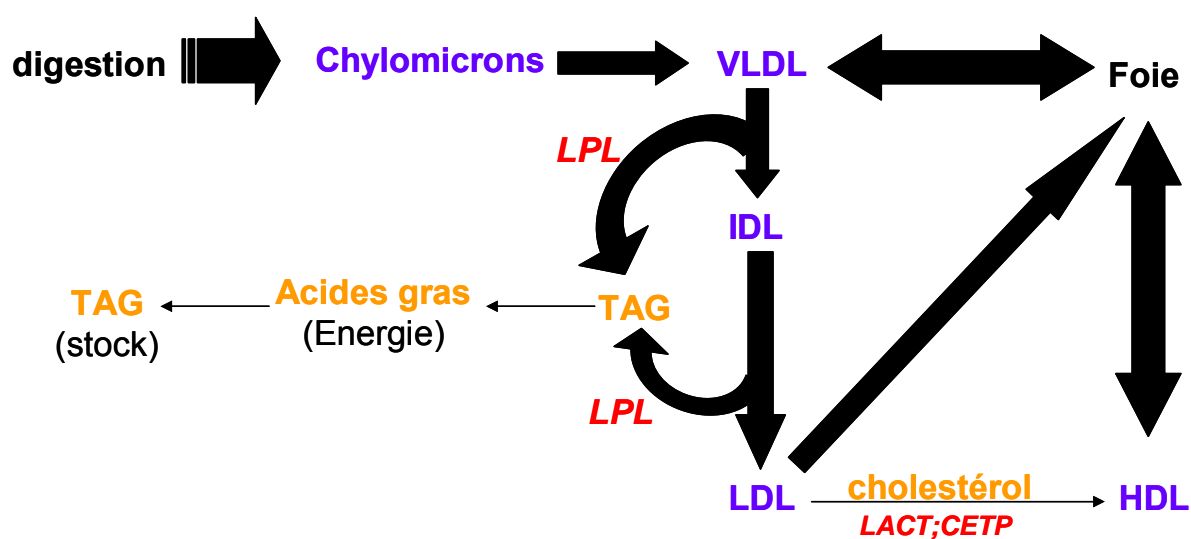


Figure 5. Métabolisme simplifié des lipoprotéines.

LPL : lipoprotéine lipase ; TAG : triacylglycerol ; LCAT : lechitin-cholestérol tranferase ; CETP : cholesteryl ester transfér protein.

Le taux plasmatique de LDL est régulé par le foie. Celui-ci est responsable de 75% de la captation des LDL. Le mécanisme par lequel les LDL sont captées est le même au niveau des cellules hépatocytaires et des autres cellules de l'organisme. Ces cellules expriment un récepteur à l'apolipoprotéine B-100 des LDL (LDL-R) (Figure 6 à gauche). Les LDL-R sont localisés dans des puits recouverts de clathrine. La liaison des LDL au récepteur entraîne leur endocytose. La vésicule contenant les LDL fusionne avec un lysosome et les LDL sont dégradées en acide aminé, triglycérides et cholestérol (Figure 6). Chez l'homme, la mutation du récepteur aux LDL est responsable d'un taux plasmatique élevé en LDL. Cette pathologie, dénommée hypercholestérolémie familiale, est caractérisée par des atteintes cardiovasculaires graves, principalement dues à l'accumulation des LDL dans les parois artérielles et à la formation de plaques d'athérome (Brown 1975, Buja 1990). Le cholestérol s'accumule également au niveau de la peau et des tendons (Xanthomas). La forme homozygote touche un individu sur un million, elle entraîne une importante élévation de la concentration plasmatique en LDL (6 à 8 fois supérieure à la normale). Dans cette forme d'hypercholestérolémie familiale, les pathologies cardiaques surviennent avant l'âge de 10 ans, et la greffe de foie est nécessaire pour rétablir le catabolisme des LDL (Tableau 3).

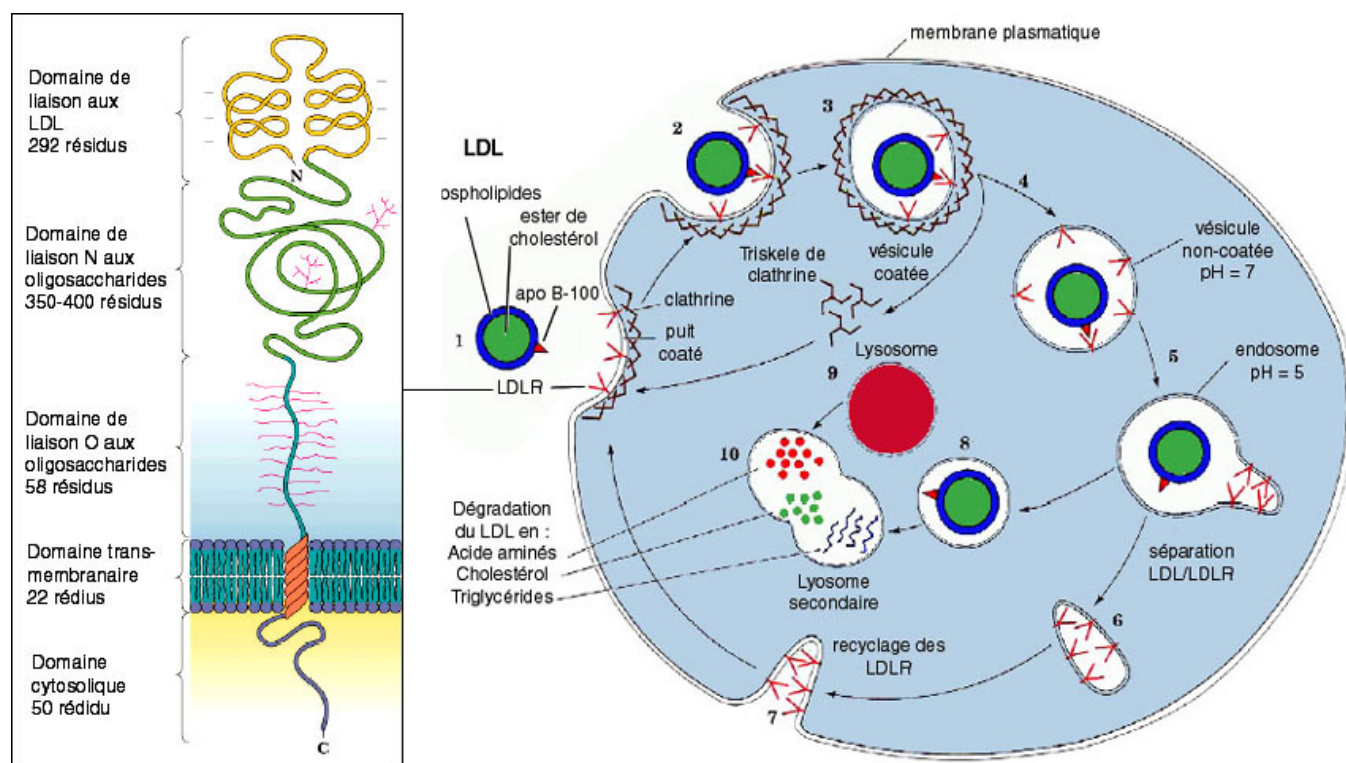


Figure 6. Catabolisme des LDL (Bryant 2003).

LDL-R (à gauche) est spécifique de l'apolipoprotéine B-100 des LDL (1). La liaison des LDL aux LDL-R (2) entraîne la formation d'endosomes par l'action des molécules de clathrine (3). La clathrine et les LDL-R sont recyclés (4-7), puis les endosomes fusionnent avec un lysosome et les LDL sont catabolisées en acide aminé, cholestérol et triglycérides (8-10).

La compréhension de ces mécanismes a permis la mise au point des principaux modèles animaux d'athérosclérose induite par un taux élevé de cholestérol plasmatique suite à la mutation de l'apo-E ou du LDL-R. Ainsi, le croisement de souris apoE^{-/-} ou LDL-R^{-/-} développant des plaques d'athérome avec des souris Knock-Out pour un gène d'intérêt a permis de caractériser de nombreuses molécules pro-athérosclérotiques ou anti-athérosclérotiques selon qu'elles favorisent ou inhibent le développement de ces plaques.

	Hétérozygote	Homozygote
fréquence	1/500	1/1.106
LDL	X 2-3	X 6-8
Pathologies cardiaques	35ans	<10ans
Pathologie associée	Xanthosomas	
traitements	Régime, Statines	Greffe de foie, plasmaphérèse

Tableau 3. Principales caractéristiques de l'hypercholestérolémie familiale.

2.2 Le transfert des LDL du sang vers la paroi artérielle

Le passage des LDL de la circulation sanguine vers la paroi artérielle s'exprime en nanolitre de LDL par unité de surface et de temps. La perméabilité moyenne de la paroi artérielle a été mesurée par différentes équipes à l'aide de LDL radiomarquées. En fonction du modèle utilisé et de l'artère étudiée, les estimations sont comprises entre 5 et 100 nl/cm²/h à une pression de 75 mmHg. En comparaison, la perméabilité à l'eau à cette pression est bien plus élevée et vaut 11000 nl/cm²/h. La structure de l'endothélium vasculaire sain constitue donc une barrière relativement imperméable aux particules de 25 nm de diamètre que sont les LDL (Nielsen 1996).

a. Mécanismes du transfert

(a) Transfert par diffusion

Bien que certains échanges de cholestérol et de phospholipides puissent avoir lieu entre les LDL et les cellules endothéliales, les particules de LDL sont généralement retrouvées intactes dans la paroi artérielle. Le passage des LDL du sang vers la paroi artérielle n'est pas saturable, ce qui suggère une diffusion passive de ces particules à travers l'endothélium vasculaire (Wiklund 1985). Cette diffusion peut se faire à travers les cellules endothéliales (transcytose) ou au niveau de pores situés entre deux cellules endothéliales. Les études réalisées sur des artères saines et utilisant des LDL marquées indiquent que les LDL sont localisées dans des vésicules à l'intérieur des cellules endothéliales puis plus tardivement dans l'espace sous-endothélial. Elles suggèrent donc que les LDL diffusent principalement par transcytose (Vasile 1983). Néanmoins, la présence de pores de 25 à 300 nm a été mise en évidence au niveau de l'endothélium (Kao 1994). De plus, différentes études indiquent que les sites de division ou de mort cellulaire au niveau de l'endothélium constituent des sites de diffusion intercellulaires pour les LDL (Lin 1990).

(b) Transfert médié par récepteur

Si les LDL-R ne semblent pas jouer un rôle important dans le passage des LDL du sang vers la paroi artérielle, un récepteur aux LDL oxydées a toutefois été mis en évidence au niveau des cellules endothéliales. Ce récepteur dénommé LOX-1 est relativement peu exprimé en

conditions basales. Son expression est induite par les cytokines proinflammatoires, l'angiotensine II, par le stress oxydant et lors du diabète (Sakurai 2003). De plus, il a été montré que LOX-1 est régulé positivement par son propre ligand, les LDLox (Aoyama 1999). LOX-1 ne participe donc pas au passage des LDL en condition normale mais joue un rôle significatif lors de l'athérosclérose (détaillé dans le paragraphe suivant).

b. Transfert des LDL et athérosclérose

(a) Modification de la diffusion des LDL et athérosclérose

- Stade précoce

La perméabilité de l'endothélium vasculaire aux LDL est augmentée aux sites de dysfonction endothéliale, ce qui favorise leur accumulation et le développement de la plaque d'athérome. Chez le lapin, le nombre de pores par cm^2 passe de 15 dans les régions résistantes de l'aorte abdominale à 150 dans les régions de dysfonction endothéliale localisées au niveau des bifurcations aortiques (Morrel 1987). Ce phénomène est probablement dû aux forces de cisaillement faibles et oscillantes présentes dans des régions de dysfonction endothéliale qui induisent la division des cellules endothéliales (Chien 2003), augmentant ainsi la perméabilité de l'endothélium au niveau des sites de divisions cellulaires (Weinbaum 1985) (Figure 7).

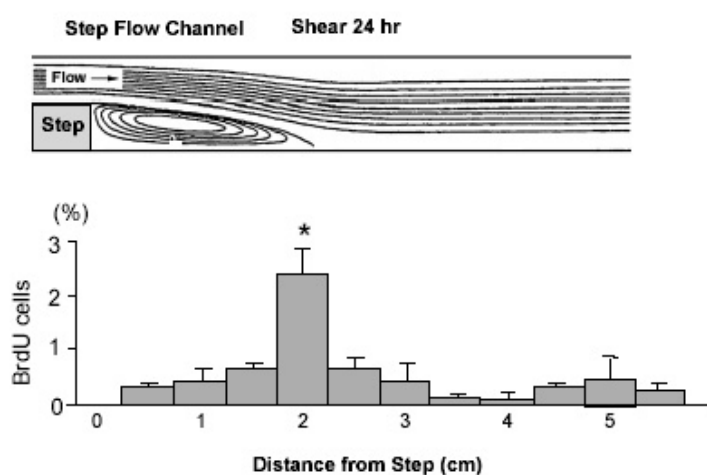


Figure 7. La prolifération des cellules endothéliales d'aorte bovine est quantifiée par l'incorporation de BrdU. Un obstacle (step) permet de simuler les perturbations de l'écoulement du flux observées aux sites de bifurcations artérielles. Les cellules situées dans la zone perturbée de l'écoulement se divisent significativement plus que les cellules soumises à un flux laminaire (Chien 2003).

Enfin, il a été mis en évidence que de nombreux facteurs de risque de l'athérosclérose tels que le tabac et l'hypertension augmentent la perméabilité de l'endothélium aux LDL ainsi que leur rétention (Nielsen 1996).

- Stade tardif

Il a été démontré chez le singe que lorsque la lésion athérosclérotique est établie la perméabilité de l'endothélium pour les LDL est multipliée par 6 (Nielsen 1996). Cette augmentation de la perméabilité est notamment liée à la dégradation de la matrice extracellulaire par les monocytes et les cellules musculaires lisses et à la dégradation de la limitante élastique interne lors de la migration des cellules musculaires lisses (Weinbaum 1993).

(b) Le rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose

En plus de sa contribution à l'accumulation de LDLox immunogènes dans la paroi artérielle, LOX-1 exerce une action proinflammatoire directe de l'endothélium vasculaire. L'incorporation des LDLox dans les cellules endothéliales entraîne une dysfonction cellulaire incluant la production de radicaux libres de l'oxygène et l'activation du récepteur nucléaire proinflammatoire NF- κ B (Figure 8) (Chen 2002). Les LDLox circulantes vont donc amplifier la réponse inflammatoire et la formation de la plaque d'athérome via LOX-1. De plus, LOX-1 est également capable de lier les plaquettes et les leucocytes circulants, et il a été mis en évidence que l'interaction LOX-1/neutrophile joue un rôle important dans le recrutement de ces cellules en participant au phénomène de « rolling » (Honjo 2003).

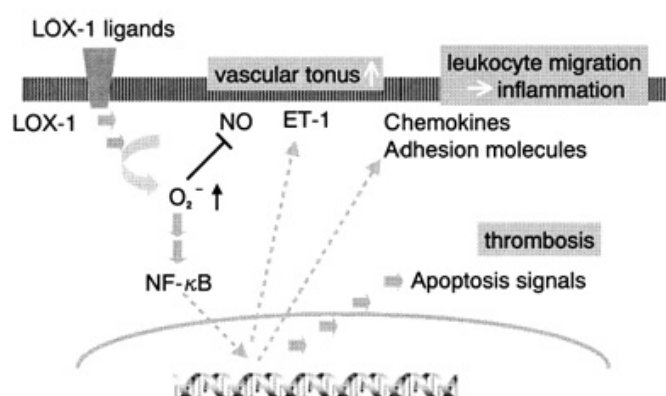


Figure 8. L'incorporation des LDLox *via* LOX-1 induit la génération d'anion superoxyde qui inactive le NO et active le NF- κ B, ce qui résulte en la production d'endothéline I vasoconstrictrice, de chemokine (MCP-1) et de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-I, P-Selectine) (Chen 2002).

2.3 L'origine des LDL oxydées

L'athérosclérose est initiée préférentiellement dans les zones de dysfonction endothéliale par des LDL oxydées immunogènes qui initient le recrutement des macrophages. L'origine de ces LDL oxydées est encore discutée (Kovanen 2003). Deux concepts sont proposés. Dans le premier, les modifications des LDL ont lieu dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle (Steinberg 1989). Dans le second, ces modifications ont lieu dans la circulation sanguine. Celui-ci est supporté par le fait qu'on retrouve des LDL oxydées dans le sang, même si les LDL sont rapidement isolées du plasma dans des conditions anti-oxydantes optimales (Avogaro 1988). Ces deux concepts ne s'opposent pas, et on s'accorde à penser que les processus d'oxydation s'initient dans la circulation et se poursuivent dans la paroi artérielle (Figure 9) (Navab 2002).

Des transferts de phospholipides et d'hydroperoxydes de cholestérol se font de manière spontanée entre les membranes cellulaires et les LDL circulantes et peuvent également être responsables des premières oxydations. Les hématies potentiellement très oxydatives constituent un bon candidat, et ceci pourrait expliquer en partie le lien entre les pathologies rénales et cardiovasculaires. En effet, en cas de dysfonctionnement rénal, l'hémolyse intravasculaire pourrait résulter en une formation accrue de LDL oxydées proathérogéniques. De plus, durant leur passage dans les tissus périphériques, les LDL peuvent également subir des modifications, c'est par exemple le cas au niveau des sites inflammatoires riches en molécules oxydantes. Enfin, l'alimentation constitue également une source de molécules susceptibles d'oxyder les LDL (Staprans 2003). Ces LDL enrichies en hydroperoxydes de cholestérol sont ensuite modifiées dans l'espace sous-endothélial. L'une des enzymes impliquées dans ces modifications secondaires est la 15-lipoxygénase (15-LO).

Dans un troisième temps, les LDL sont sujettes à des modifications non enzymatiques et acquièrent leur pouvoir immunogène. Ainsi, l'oxyde nitrique (NO), produit par la NO Synthase inductible (iNOS) des macrophages, est un oxydant potentiel au sein de la paroi artérielle (Ross 2001).

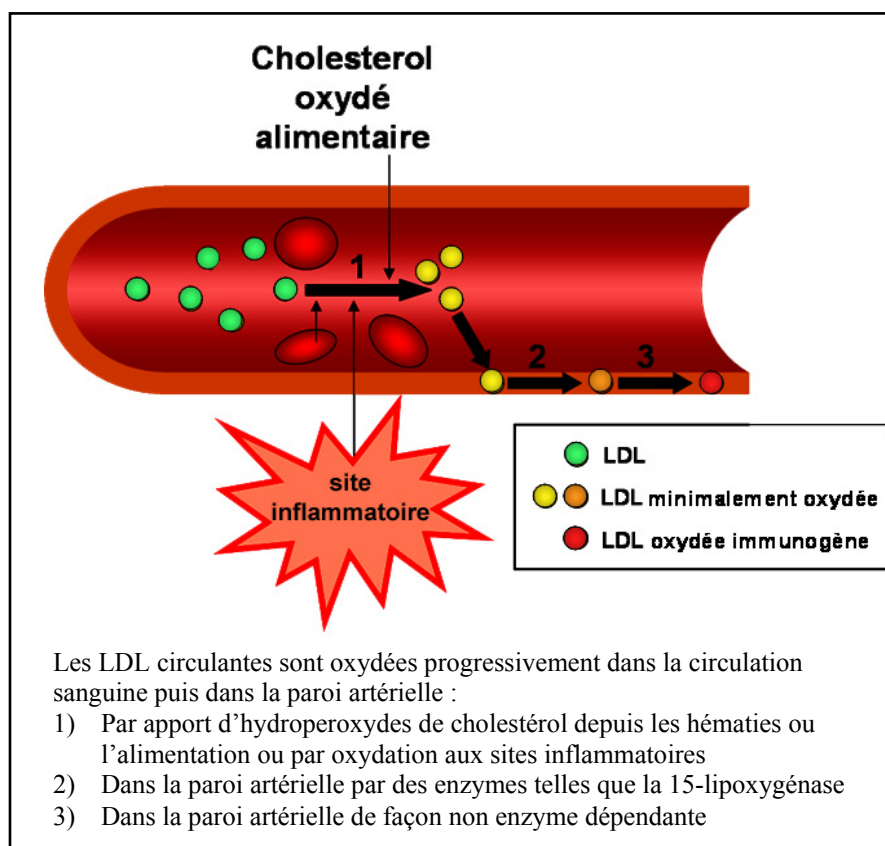


Figure 9. Origine des LDL oxydées.

Parmi les LDL immunogènes, on distingue les LDL minimalement modifiées ou LDLmm et les LDL plus fortement oxydées ou LDLox. Le pouvoir immunogène des LDLox est plus important et elles ne sont plus reconnues par les récepteurs aux LDL mais par une série de récepteurs exprimés par les macrophages et les cellules musculaires lisses, dénommés récepteurs « Scavenger » (SR-A et CD 36). Ces LDL immunogènes induisent la synthèse de nombreuses molécules proinflammatoires, telles que les molécules d'adhésion. Les voies moléculaires reliant les LDL oxydées à l'expression de gènes proinflammatoires sont en cours d'étude (Leitinger 2003).

En conditions physiologiques, les HDL sont capables de reverser l'oxydation des LDL grâce à deux enzymes, la Plasma-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) et la Paraonoxase (PON). Mais lors d'une inflammation exacerbée ou chronique, les HDL sont modifiées et perdent ces deux enzymes (Kovanen 2003).

C. Le recrutement des monocytes

1. Les molécules d'adhésion

En conditions normales, le recrutement de monocytes au sein de la paroi artérielle et leur différenciation en macrophages est un phénomène protecteur qui permet l'élimination des LDLox cytotoxiques et pro-inflammatoires ainsi que des cellules apoptotiques. Mais l'accumulation de macrophages chargés en LDLox peut induire la formation d'une lésion athérosclérotique. Le recrutement des monocytes aux sites de dysfonction endothéliale est régulé par des molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire. Les forces de cisaillement faibles et les LDLox sont deux stimuli majeurs pour l'expression de ces molécules d'adhésion (Malek 1999, Kume 1992). Ces molécules d'adhésion appartiennent à la famille des sélectines, aux ligands des sélectines, aux intégrines et aux immunoglobulines (Huo 2001).

1.1 Les sélectines : le « rolling »

Les sélectines sont responsables du phénomène de « rolling » des leucocytes à la surface de l'endothélium (Figure 10). Ce phénomène correspond à l'établissement puis à la rupture des liaisons établies entre les sélectines exprimées par les cellules endothéliales avec leurs ligands exprimés à la surface des leucocytes et se traduit par un ralentissement des leucocytes qui roulent à la surface de l'endothélium. La E-sélectine et la P-sélectine sont exprimées au niveau de l'endothélium activé, alors que la L-sélectine est constitutivement exprimée par l'endothélium. Le principal ligand de ces sélectines est la P-Selectin Glycoprotein-1 (PSGL-1). L'inhibition de la liaison des sélectines avec leur ligand ainsi que l'étude de souris Knock-Out pour ces molécules ont permis de mettre en évidence leur rôle majeur dans le recrutement des leucocytes circulants et la formation de la plaque d'athérome. L'inhibition du phénomène de « rolling » se traduit par une forte diminution de l'adhésion des leucocytes au site inflammatoire. Ainsi, sur un modèle de carotide isolée et perfusée de souris athérosclérotiques ApoE^{-/-}, Ramos et al. observent une forte diminution du « rolling » et de l'attachement des leucocytes mononucléés en présence d'un anticorps anti P-sélectine ou anti PSGL-1 (Ramos 1999). D'autre part, la taille des plaques d'athérome observées à 4 mois au niveau de l'aorte des souris obtenues par croisement de souris P-sélectine^{-/-} et apoE^{-/-} est 3,5 fois plus faible que

celle des souris apoE^{-/-} (Dong 2000). Le rôle de la E-sélectine dans la formation de la plaque d'athérome est plus controversé. Ainsi, O'Brian observe en immunohistochimie sur des aortes humaines que la E-sélectine est exprimée dans 32% des plaques et est absente des aortes saines (O'Brian 1996). En revanche, Iiyama et al. n'ont pas détecté la présence de la protéine ou de son ARNm chez la souris et chez le lapin (Iiyama 1999).

1.2 Les immunoglobulines et VCAM-1 : adhésion et transmigration

a. Adhésion

L'adhésion des leucocytes à travers l'endothélium nécessite une interaction entre les immunoglobulines, molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire, et leurs molécules d'adhésion, des intégrines exprimées par les leucocytes (Figure 10). Cette liaison permet la transition entre la phase de « rolling » et une adhésion ferme des leucocytes à la surface de l'endothélium. Les molécules de la superfamille des immunoglobulines sont des protéines transmembranaires possédant une série de motifs extracellulaires communs à ceux des immunoglobulines G (IgG-like domains) et un court domaine cytoplasmique. Parmi les molécules d'adhésion appartenant à cette superfamille, on distingue les molécules d'adhésion intercellulaires 1, 2 et 3 (ICAM-1, 2, 3), la molécule d'adhésion endothéliale et plaquettaire 1 (PECAM-1 ou CD31) et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1). Leurs ligands, les intégrines, sont des hétérodimères composés d'une sous-unité β liée de manière non covalente à une sous-unité α . Les intégrines formées avec la sous-unité β_1 (CD29) sont aussi appelées antigènes très tardifs (Very Late Antigen) car elles sont exprimées tardivement par les lymphocytes à la suite de leur activation. L'une d'elles, VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) est le principal ligand de VCAM-1. ICAM-1, 2 et 3 sont des ligands de l'intégrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), et ICAM 1 et 2 lient également $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1). PECAM-1 est un ligand de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ mais réalise principalement des liaisons homotypiques avec des molécules PECAM-1 exprimées à la surface d'autres cellules. Les expressions de ICAM-1 et VCAM-1 sont augmentées ou induites lors d'une activation endothéliale. En revanche, PECAM-1 est constitutivement exprimée par l'endothélium. Les trois principales molécules d'adhésion dont l'expression est induite au niveau de l'endothélium lors de la formation de la plaque d'athérome sont donc la P-Sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 (Huo 2001).

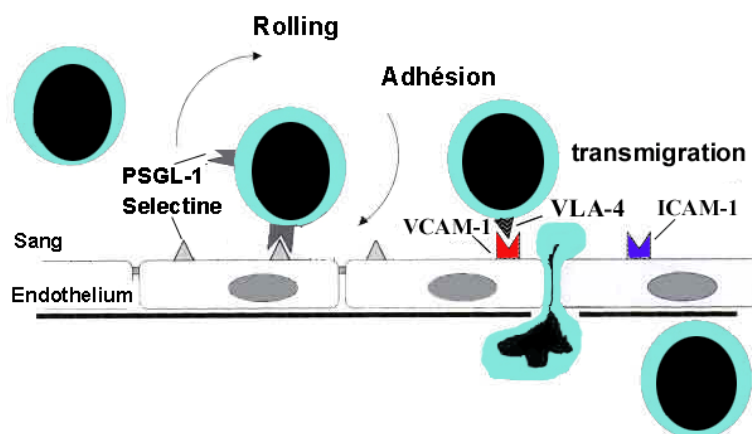


Figure 10. Recrutement d'un leucocyte dans la paroi artérielle.

La liaison des sélectines avec leur ligand entraîne un phénomène de « rolling », puis les liaisons immunoglobulines-intégrines permettent une adhésion ferme du monocyte à la surface de l'endothélium et la transmigration du monocyte. PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein 1, VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VLA-4 : Very Late Antigen 4, ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1.

VCAM-1 :

En décembre 1989, deux équipes publient la découverte de VCAM-1. Rice et al. l'ont décrit comme une glycoprotéine de 110 kda inductible à la surface de l'endothélium, capable de lier les cellules cancéreuses d'un mélanome et l'ont nommé INCAM-110 (Rice 1989) (Figure 11). En 1990, la même équipe montre également la liaison des lymphocytes et monocytes sanguins à INCAM-110 (Rice 1990). Parallèlement, Osborn et al. clonent une molécule de la famille des immunoglobulines exprimée par l'endothélium activé avec du TNF- α ou de l'Il-1 (Osborn 1989). Cette molécule, dénommée VCAM-1, est capable d'induire le recrutement de leucocytes mononucléés, mais pas celui des polynucléaires, lorsqu'elle est transfectée à des cellules endothéliales humaines de veines de cordon ombilical en culture (HUVEC). Cette spécificité est élucidée en 1990 par Elices et al. En effet, les auteurs caractérisent la liaison VCAM-1/VLA4 (Elices 1990). Or VLA-4 est exprimé par les leucocytes mononucléés mais pas par les polymorphonucléaires (Schwartz 1990). Il a finalement été démontré que INCAM-110 et VCAM-1 ne constituent qu'une seule et même protéine (Taichman 1991).

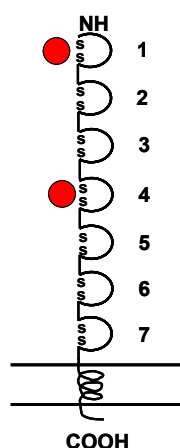


Figure 11. Structure de VCAM-1.

VCAM-1 possède deux sites de liaison pour VLA-4 au niveau des domaines extracellulaires 1 et 4 (cercles). D'après Cybulsky 2001.

En 1991, Cybulsky et al. démontrent la présence de VCAM-1 au niveau des plaques d'athérome chez le lapin Watanabe Hypercholestérolémique et Hyperlipidémique (WHHL), un modèle animal développant spontanément des plaques (Cybulsky 1991). L'expression de VCAM-1 a également été mise en évidence par immunohistochimie au niveau des plaques d'athérome chez la souris et chez l'homme (Iiyama 1999, O'Brien 1993, O'Brien 1996). Ces différentes études ont permis de mettre en évidence une restriction de l'expression de VCAM-1 au niveau des lésions athérosclérotiques, contrairement à celle de ICAM-1 qui s'étend hors des plaques d'athérome au niveau de l'endothélium des zones saines. Aux stades précoces de l'athérogénèse, VCAM-1 est exprimée par les cellules endothéliales, puis, aux stades plus tardifs, l'expression de VCAM-1 est également observée au sein de la plaque. Cette présence intra-plaque de VCAM-1 correspond à son expression par l'endothélium de la néovasculature mais également par les cellules musculaires lisses ayant migré dans l'intima, les cellules musculaires lisses de la média et les macrophages. Ceci suggère que les cellules inflammatoires peuvent pénétrer dans la plaque au niveau du *vasa vasorum* de la média et de l'adventice (O'Brien 1993). D'autre part, l'expression de VCAM-1 dans les plaques d'athérome humaines est très fortement corrélée au recrutement des monocytes et lymphocytes, ce qui suggère que VCAM-1 joue un rôle crucial dans le développement de l'inflammation lors de l'athérogénèse. Les souris VCAM-1^{-/-} n'étant pas viables, un modèle de souris transgénique possédant une VCAM-1 tronquée au niveau de son 4^{ème} domaine extracellulaire a été généré (VCAM-1^{D4D/D4D}). Le croisement de ces souris VCAM-1^{D4D/D4D} avec des souris athérosclérotiques LDLR^{-/-} aboutit à une réduction de 40% de la surface des

plaques, ce qui indique que VCAM-1 joue un rôle majeur dans l'athérogénèse (Ley 2001, Cybulsky 2001).

b. La transmigration endothéliale

La transmigration endothéliale ou diapédèse est un processus rapide durant lequel le leucocyte émet un pseudopode pour franchir la barrière endothéliale. Il nécessite le désassemblage du cytosquelette du leucocyte du côté apical de l'endothélium puis son réassemblage dans l'espace sous-endothélial. *In vitro*, un neutrophile accomplit ce processus en 90 secondes. La jonction serrée entre les cellules endothéliales se reconstitue ensuite en moins de 5 minutes. Deux interactions moléculaires homophiliques jouent un rôle majeur lors de la diapédèse : la liaison PECAM-1/PECAM-1 et la liaison CD99-CD99. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* indiquent que la suppression ou le blocage de l'une ou l'autre de ces molécules stoppe la diapédèse des leucocytes (Schenkel 2002, Bogen 1994). Cependant, lorsque PECAM-1 est bloqué, les leucocytes sont stoppés en surface de l'endothélium alors que lorsque CD99 est bloqué ils sont stoppés à l'intérieur de la jonction endothéliale, ce qui indique que CD-99 est impliqué lors d'une étape distale de celle impliquant PECAM-1. Les molécules d'adhésion jonctionnelle JAM-A, B et C et la « Vasculaire Endothéliale Cadherin » (VE-cadherin) sont également impliquées dans ce processus. Ces six molécules d'adhésion sont concentrées en bordure des cellules endothéliales et toutes peuvent réaliser des liaisons homophiliques (Figure 12). PECAM-1, CD99, JAM-A et JAM-C sont également exprimées à la surface des leucocytes, et peuvent donc réaliser des liaisons homophiliques avec les molécules d'adhésion exprimées au niveau des jonctions endothéliales.

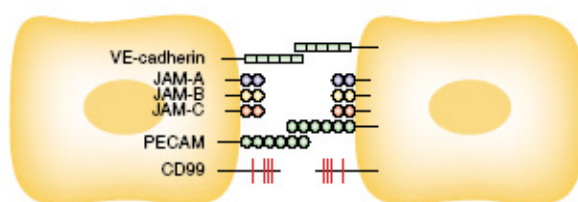


Figure 12. Molécules d'adhésion mises en jeu lors de la transmigration endothéliale (Muller 2003).

Le signal de transmigration nécessite une augmentation transitoire de la concentration calcique à l'intérieur des cellules endothéliales adjacentes au site de transmigration (Huang 1993). Ce signal active la chaîne légère de la myosine et induit la rétraction des cellules

endothéliales (Figure 13). Il est induit par des protéines cationiques solubles relarguées par les leucocytes activés ainsi que par la liaison des leucocytes aux sélectines et à VCAM-1.

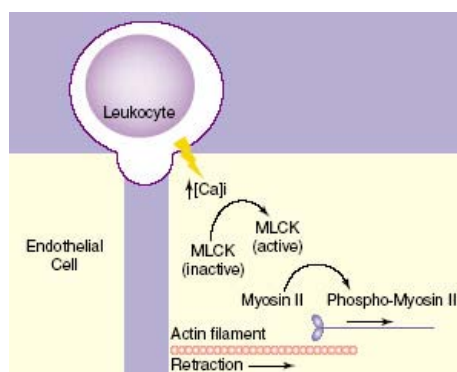


Figure 13. Une élévation transitoire du calcium libre intracellulaire au niveau des cellules endothéliales adjacentes au site de transmigration induit leur rétraction (Muller 2003).

Lors de la diapédèse, PECAM-1 est recyclée au niveau de la jonction entre l'endothélium et la cellule endothéliale est participe à l'allongement du pseudopode. La migration du leucocyte est sous le contrôle de la machinerie du cytosquelette. Sous l'effet de différents stimuli incluant l'adhésion à l'endothélium, les protéines Rho, des GTPases, sont activées et régulent l'assemblage et le désassemblage des podosomes ainsi que la polarité de migration et la rétraction de la queue cytoplasmique (Worthylake 2001).

2. Les cytokines

Le recrutement des monocytes, notamment lors de leur passage entre les cellules endothéliales, est stimulé par la production de molécules chémoattractrices telles que la «Macrophage Chemotactic Protein 1» (MCP-1) qui se fixe au récepteur CCR2 à la surface des monocytes. MCP-1 est produite à la fois par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages. Une chémokine de la classe des chémokines CXC, l'interleukine 8 (IL-8), joue également un rôle dans le recrutement des monocytes lors de l'athérosclérose par liaison aux récepteurs CXC 2 (CXCR-2) (Glass 2001, Libby 2002) (Figure 14).

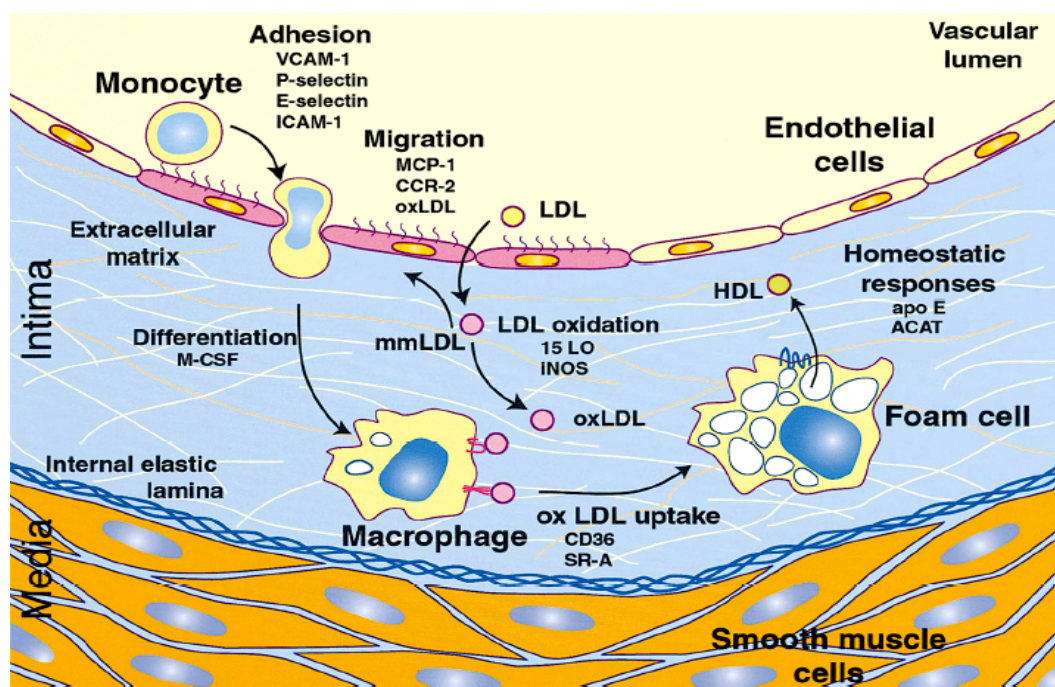


Figure 14. Initiation de l'athérosclérose (Glass 2001).

Les LDLox induisent le recrutement de monocytes aux sites de dysfonction endothéliale et leur transformation en cellules spumeuses dans l'intima. (VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, ICAM-1 : Intercellular Cell Adhesion Molecule 1, M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor, MCP-1 : Macrophage Chemoattractant Protein 1, 15LO : 15 Lipoxygénase, SR-A : Scavenger Receptor A, ApoE : Apolipoprotéine E, ACAT : Acyl CoA Cholesterol Acetyl Transferase.

D. La formation des cellules spumeuses

Dans l'intima, sous l'effet de facteurs de croissance, les monocytes se différencient en macrophages. Le « Macrophage Colony Stimulating Factor » (M-CSF) joue un rôle clef dans cette activation. L'accumulation massive de cholestérol au sein de ces macrophages aboutit à la formation de cellules spumeuses. Les LDL natives ne peuvent pas induire la formation des cellules spumeuses car leur captation par les macrophages est lente, et parce qu'il existe une régulation négative de leurs récepteurs en réponse au cholestérol intracellulaire qui empêche leur accumulation intracytoplasmique. En revanche, les LDL acétylées ou oxydées peuvent induire la formation des cellules spumeuses. Leur captation est rapide et leurs récepteurs ne sont pas régulés négativement. Ces récepteurs, exprimés par les macrophages en réponse au M-CSF sont des récepteurs « Scavenger » (Yamada 1998, Steinberg 2002) (Figure 15).

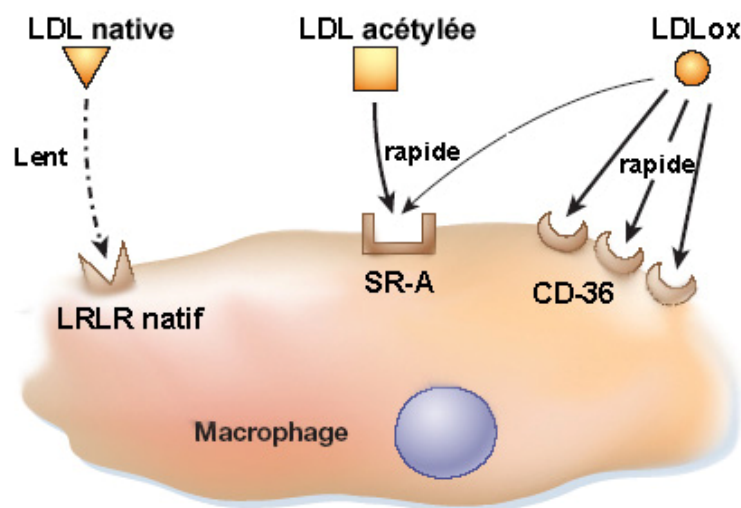


Figure 15. LDLox et récepteurs « Scavenger ».

Les LDL acétylées et oxydées ne sont plus reconnues par les récepteurs aux LDL (LDL-R) mais par des récepteurs « Scavenger » (SR-A et CD36). D'après Steinberg D (2002).

Le cholestérol des LDLox est stocké au sein de lysosomes sous forme de cholestérol libre. Si sa ressortie, essentiellement assurée par les HDL, n'est pas suffisamment élevée, le cholestérol libre est ré-estérifié et s'accumule dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques. Ce sont ces cellules chargées de gouttelettes lipidiques que l'on nomme cellules spumeuses. Les macrophages et les cellules spumeuses prolifèrent et sécrètent un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines qui vont amplifier la réponse inflammatoire, permettant ainsi la progression de l'athérosclérose (Libby 2002, Li 2002).

E. La progression de l'athérosclérose

Le développement de la plaque d'athérome est caractérisé par l'amplification de la réponse inflammatoire. De nouveaux monocytes et des lymphocytes sont recrutés. Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sont donc capables d'activer les lymphocytes T recrutés en lymphocytes T « helper » 1 et 2 (Th1 et Th2) (Ross 1999) (Figure 16). Les principaux antigènes présentés résultent de l'apprêtement des LDLox captées par les macrophages.

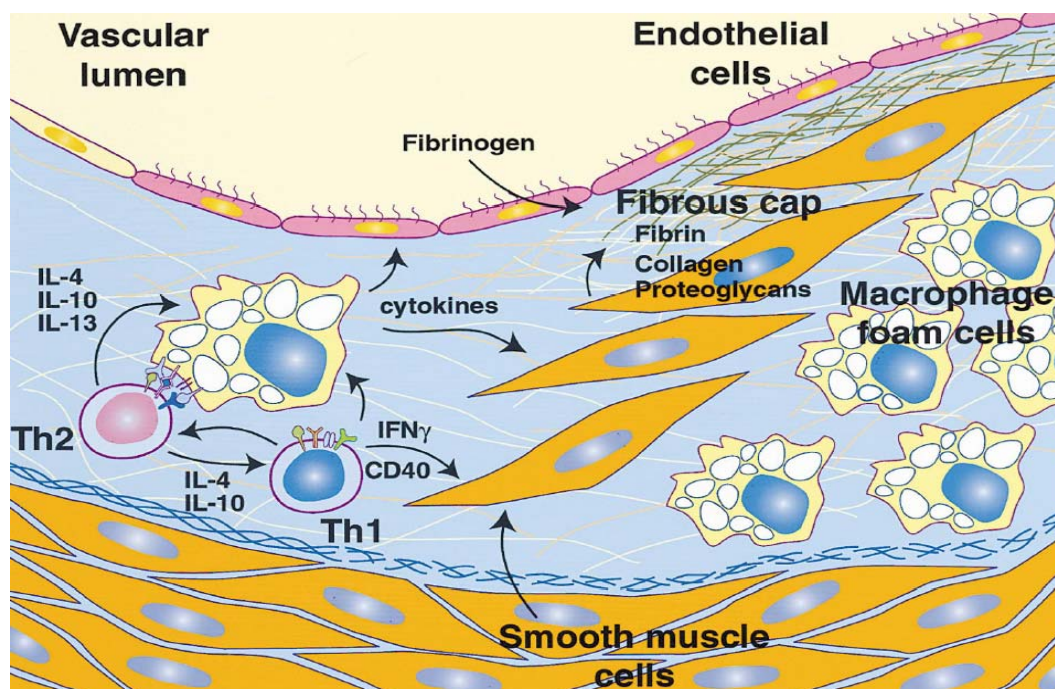


Figure 16. Développement de la plaque d'athérosclérose (Glass 2001).
(IL : interleukine, IFN γ : interféron γ)

L'interaction entre les macrophages et les lymphocytes Th1 et Th2 engendre la production d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires (interleukines, interféron γ) qui vont moduler l'inflammation et agir sur de nombreuses cellules au sein de la paroi artérielle. Ces molécules vont notamment stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration depuis la média vers l'intima. Ces cellules musculaires lisses intimaux dégradent la matrice extracellulaire afin de pouvoir proliférer et captent les LDLox, participant ainsi à la formation des cellules spumeuses. Elles jouent également un rôle stabilisateur de la plaque par la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire - fibrinogène, collagène et protéoglycanes - qui recouvre la plaque d'athérome d'une capsule fibreuse (Ross 1999, Glass 2001). Par ailleurs, les lymphocytes T, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses expriment toutes CD40 et CD40L, or l'interaction cellule-cellule par la liaison de la protéine CD40 avec son récepteur CD40L joue également un rôle important dans le développement de la plaque puisqu'elle induit la synthèse de nombreuses molécules pro-athérogéniques. Ces facteurs pro-athérogéniques incluent des cytokines inflammatoires, des métalloprotéinases (MMPs) qui dégradent la matrice extracellulaire et déstabilisent la plaque, et le facteur tissulaire (TF) pro-thrombotique (Mach 1998). Ainsi, le recrutement et l'activation de lymphocytes Th1 et Th2 amplifie l'inflammation et stimule la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses.

F. Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérome

Les plaques caractérisées par des phénomènes inflammatoires chroniques et par un large cœur lipidique et nécrotique mou, recouvert par une fine capsule fibreuse, sont instables. Cette instabilité est exacerbée par les phénomènes inflammatoires qui stimulent les phénomènes apoptotiques et la dégradation de la matrice extracellulaire.

1. Apoptose et athérosclérose

Les plaques d'athérome peuvent être le siège d'intenses processus apoptotiques (Mallat 2001). L'apoptose survient au niveau de tous les types cellulaires. Ce sont essentiellement les macrophages et les lymphocytes T qui sont touchés, mais les cellules endothéliales peuvent aussi être affectées (Tricot 2000). L'apoptose des macrophages est fréquemment observée à la base des plaques en bordure de la plage lipidique, ce qui suggère que la mort des macrophages par ce processus contribue à la croissance de la plage lipidique dans laquelle les corps apoptotiques s'accumulent pour former un corps lipidique et nécrotique qui déstabilise la plaque. L'apoptose de l'endothélium est également pro-athérogène à tous les stades de la plaque. L'apoptose des cellules musculaires lisses peut limiter l'extension et la prolifération intimale de ces cellules, limitant ainsi le développement sténosant de la plaque, mais elle va également affaiblir la plaque en diminuant la synthèse fibreuse qui recouvre et stabilise la plage lipidique et nécrotique instable (Toussaint 2003).

Le degré de la réaction inflammatoire détermine en grande partie le taux de cellules apoptotiques. L'apoptose est induite soit par des interactions cellulaires directes, soit par l'action de cytokines (Glass 2001). Les LDL oxydées sont toxiques pour les cellules spumeuses (macrophages et cellules musculaires lisses). Leur injection aboutit à l'apoptose de ces cellules et à la formation de vacuoles lipidiques et nécrotiques qui fusionnent en une large plage molle qui déstabilise la plaque (Figure 17). D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires peuvent également induire ce processus par la production excessive de monoxyde d'azote conduisant à la formation de radicaux libres de l'oxygène (Tricot 2000). Chez l'homme, l'expression de la NO synthase inductible est directement corrélée à la survenue de ce phénomène au sein des plaques d'athérome. A l'inverse, l'expression locale de cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 est associée à une diminution de l'expression de la NO synthase inductible et à une diminution de l'apoptose (Mallat 1999).

L'apoptose joue donc un rôle déterminant dans la fragilisation de la plaque d'athérome mais également dans la formation du thrombus. En effet, l'apoptose fragilise la plaque en réduisant l'épaisseur de la capsule fibreuse et en augmentant la taille du corps lipidique et nécrotique et, de plus, les corps apoptotiques sont procoagulants. Le phénomène d'apoptose joue donc un rôle déterminant dans l'évolution de la plaque d'athérome vers la plaque à risque (Toussaint 2003).

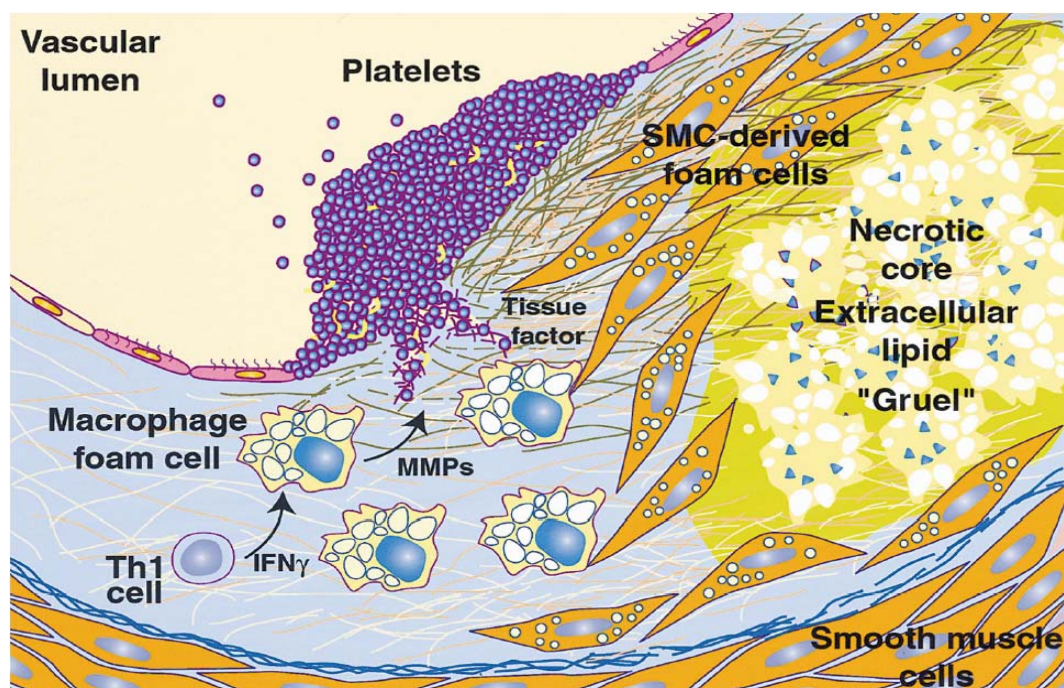


Figure 17. Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérome (Glass 2001).

Les cellules spumeuses issues des macrophages et des cellules musculaires lisses entrent en apoptose et forment une plaque lipidique et nécrotique instable. Les métalloprotéinases (MMPs) produites par les macrophages dégradent la matrice extracellulaire. Lors de la rupture de la plaque, les facteurs pro-thrombotiques comme le facteur tissulaire (TF) induisent la formation du thrombus (IFN γ : interféron γ).

2. Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMP) sécrétées par les macrophages et les cellules musculaires lisses lors de leur migration, telles que les collagénases, élastases et stromélinases, jouent également un rôle majeur dans la déstabilisation de la plaque en dégradant les protéines de la matrice (Galis 1994). Les lymphocytes T activés au sein de la plaque stimulent la production de ces MMP par les macrophages (Schonbeck 1997). Les MMP favorisent le remodelage de la plaque d'athérome, la migration des cellules inflammatoires et la dégradation de la capsule fibreuse qui recouvre et stabilise la plaque lipidique et nécrotique.

3. La néoangiogénèse

L'angiogénèse permet la formation et le développement des vaisseaux. C'est un processus complexe nécessitant l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Lorsque l'épaisseur de la paroi artérielle augmente durant le développement de la plaque d'athérome, des néovaisseaux se forment à partir du *vasa vasorum* afin d'irriguer le tissu nouvellement formé. Ces microvaisseaux jouent un rôle dans le développement et la rupture de la plaque d'athérome. Ils sont responsables de micro-hémorragies intraplaques qui déstabilisent la lésion (Barger 1990). Ils participent également à l'exacerbation de la réponse inflammatoire en participant au recrutement de nouveaux leucocytes (O'Brien 1996). Chez l'homme, l'angiogénèse est augmentée dans les plaques qui ont été sujettes à une rupture (Moreno 2004). La densité de la néovascularisation est augmentée au niveau des plaques présentant des phénomènes inflammatoires ainsi qu'au niveau des plaques présentant une fine capsule fibreuse. De plus, la présence de microvaisseaux à la base de la plaque d'athérome est corrélée à la rupture indépendamment des facteurs cités précédemment, ce qui indique que la néovascularisation contribue en elle-même au phénomène de déstabilisation de la plaque d'athérome.

4. Rupture et formation du thrombus

Les plaques vulnérables sont donc sujettes à la rupture. Lorsque celle-ci se produit, les molécules pro-thrombotiques contenues dans la plaque sont libérées et entrent en contact avec le sang, ce qui induit la formation d'un thrombus susceptible d'oblitérer la lumière vasculaire et d'induire une ischémie myocardique, symptomatique ou non, sur le territoire en aval. Parmi ces molécules, le facteur tissulaire (TF) est une petite glycoprotéine exprimée par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses de la plaque. Il se lie au facteur VII/VIIa dans le sang et initie la cascade de coagulation (Figure 18) (Fuster 1999). Dans 2/3 des cas, la formation du thrombus responsable de l'accident coronaire est due à la rupture ou à la fissuration d'une plaque d'athérome vulnérable, tandis que l'érosion d'une lésion athérosclérotique vulnérable est responsable du tiers des accidents restants (Madjid 2004).



Figure 18. Rupture de la plaque et formation du thrombus dans une artère coronaire (Glass 2001).

Par ailleurs, la plaque d'athérome n'évolue pas nécessairement vers la rupture mais peut également s'orienter vers un état stable fibreux ou calcifié. Une classification des différents types de plaques a été établie par l'American Heart Association (AHA).

IV. Classification des plaques d'athérome

La plaque d'athérome est une pathologie évolutive. En fonction du stade de développement, une classification des plaques a été établie par l'AHA (Stary 1994, Stary 1995).

Durant les premiers stades de l'athérosclérose, l'évolution de la pathologie est prédictible et caractéristique (I à IV), puis il existe différents types de progression résultant en différents types de lésions (Figures 19 et 20).

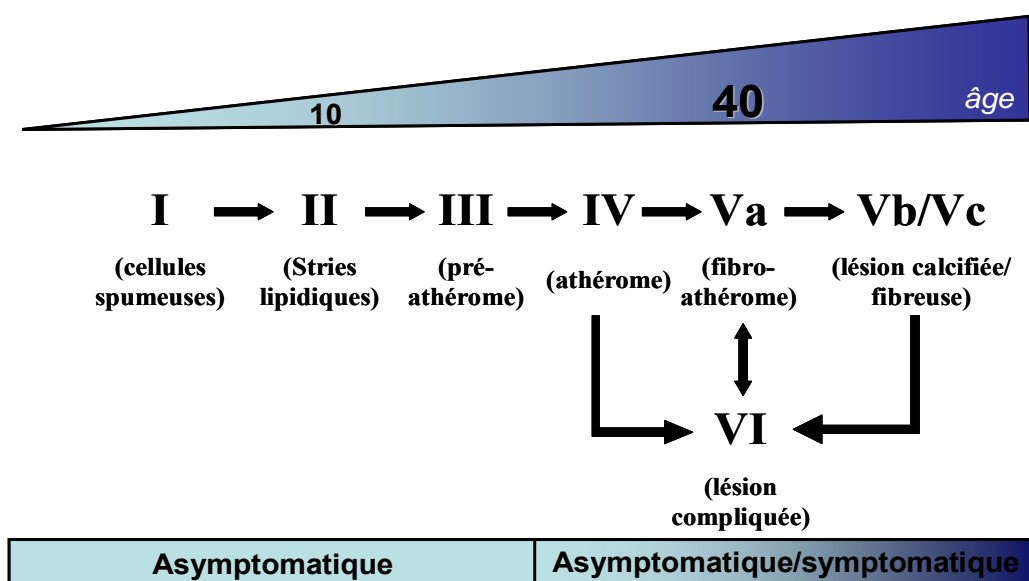


Figure 19. Classification des plaques d'athérome selon l'AHA. (D'après Stary 1994.)

- La lésion initiale de type I contient suffisamment de LDLox pour induire le recrutement des premiers macrophages et leur évolution en cellules spumeuses. Ce type de lésion se développe chez l'homme dès le début de la vie.
- La lésion de type II, ou strie lipidique, contient des cellules spumeuses issues de macrophages ainsi que des cellules musculaires chargées en lipides.
- La lésion de type III, ou pré-athérome, est caractérisée par la présence de gouttelettes lipidiques extracellulaires.
- La lésion de type IV, ou athérome, est caractérisée par un large cœur lipidique instable formé par la fusion des gouttelettes lipidiques des plaques de type III.
- La lésion de type V résulte du recouvrement de la lésion de type IV par une capsule fibreuse principalement constituée de collagène. Lorsque la plage lipidique demeure importante, il s'agit d'une lésion de type Va. Si la plage lipidique se calcifie, il s'agit d'une lésion de type Vb. Enfin, s'il n'y pas ou peu de lipides et que le tissu connectif fibreux prédomine, il s'agit d'une lésion de type Vc.
- La lésion de type VI résulte de la complication d'une lésion de type IV ou V. Il peut s'agir d'une rupture, d'un hématome, d'une hémorragie ou enfin d'une thrombose.

Les lésions sont considérées comme étant des « lésions avancées » lorsque l'accumulation de lipides, cellules et composants de la matrice induit une désorganisation et un épaissement de l'intima. Il s'agit des lésions de type IV, V et VI. Dans un premier temps, le développement de ces lésions avancées est excentrique, puis dans un second temps, elles peuvent ou non induire un rétrécissement de la lumière de l'artère, qui peut ou non permettre leur détection par angiographie. Les plaques vulnérables sujettes à la rupture sont de type IV et Va.

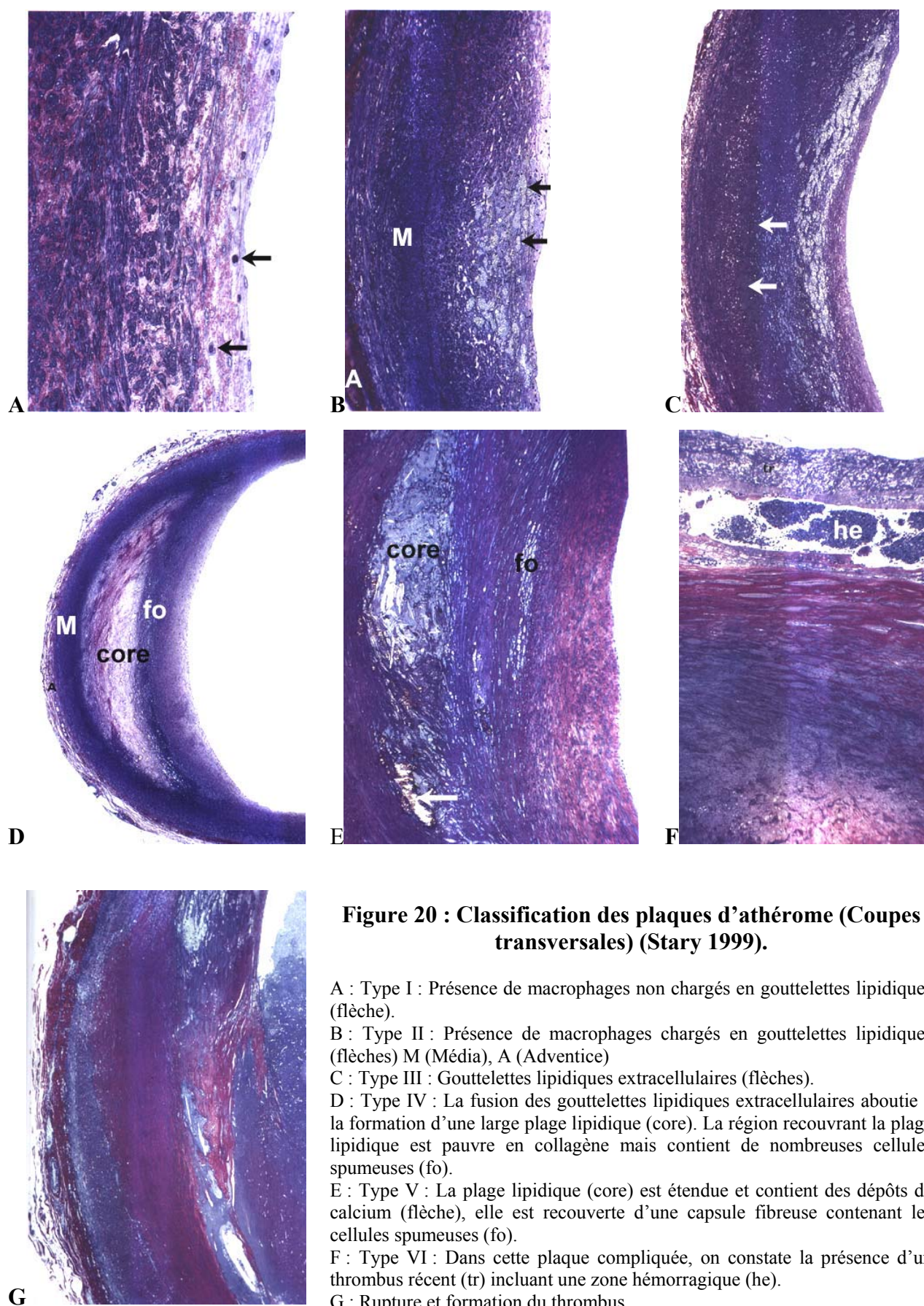


Figure 20 : Classification des plaques d'athérome (Coupes transversales) (Stary 1999).

A : Type I : Présence de macrophages non chargés en gouttelettes lipidiques (flèche).

B : Type II : Présence de macrophages chargés en gouttelettes lipidiques (flèches) M (Média), A (Adventice)

C : Type III : Gouttelettes lipidiques extracellulaires (flèches).

D : Type IV : La fusion des gouttelettes lipidiques extracellulaires aboutie à la formation d'une large plage lipidique (core). La région recouvrant la plage lipidique est pauvre en collagène mais contient de nombreuses cellules spumeuses (fo).

E : Type V : La plage lipidique (core) est étendue et contient des dépôts de calcium (flèche), elle est recouverte d'une capsule fibreuse contenant les cellules spumeuses (fo).

F : Type VI : Dans cette plaque compliquée, on constate la présence d'un thrombus récent (tr) incluant une zone hémorragique (he).

G : Rupture et formation du thrombus.

V. La plaque d'athérome vulnérable

Le terme de plaque d'athérome « vulnérable » désigne l'ensemble des plaques susceptibles d'entraîner la formation d'un thrombus ou d'évoluer très rapidement (Naghavi 2003). Les principaux critères utilisés pour les distinguer sont :

- l'inflammation,
- une fine capsule fibreuse (<100 µm) et un large cœur lipidique et nécrotique (>40% du volume de la plaque),
- des zones de dénudation endothéliale avec de l'agrégation plaquettaire superficielle,
- une fissure de la capsule fibreuse,
- une sténose sévère.

Considérant que l'organisme dans son entier peut moduler le développement de l'ensemble des plaques d'athérome, la notion de patient vulnérable a également été récemment introduite. Ainsi, une élévation de facteurs pro-athérogéniques, hypertenseurs ou pro-inflammatoires issus de différents organes et relargués dans le sang (que l'on nomme alors sang vulnérable), va précipiter l'évolution de l'ensemble des plaques d'athérome coronariennes et induire la formation d'un myocarde vulnérable.

Lorsqu'on s'intéresse à la fréquence de ces plaques, on constate que les plaques induisant une sténose sévère, bien que représentant un risque élevé de complications, sont relativement peu présentes. En revanche, les plaques d'athérome vulnérables susceptibles de se rompre sont nombreuses et leur risque de complications étant également important, ce sont elles qui sont responsables de la majorité des pathologies coronariennes (Figure 21). Ainsi, des études cliniques ont montré que dans 2 infarctus du myocarde sur 3 on ne retrouve pas de sténose coronaire >50% sur la coronaire responsable de l'infarctus (De Franco 2001). La coronarographie, qui reflète le diamètre de la lumière artérielle, ne permet donc pas de visualiser ces plaques vulnérables et la mise au point d'une nouvelle technique de détection est un enjeu clinique majeur (Glagov 1987).

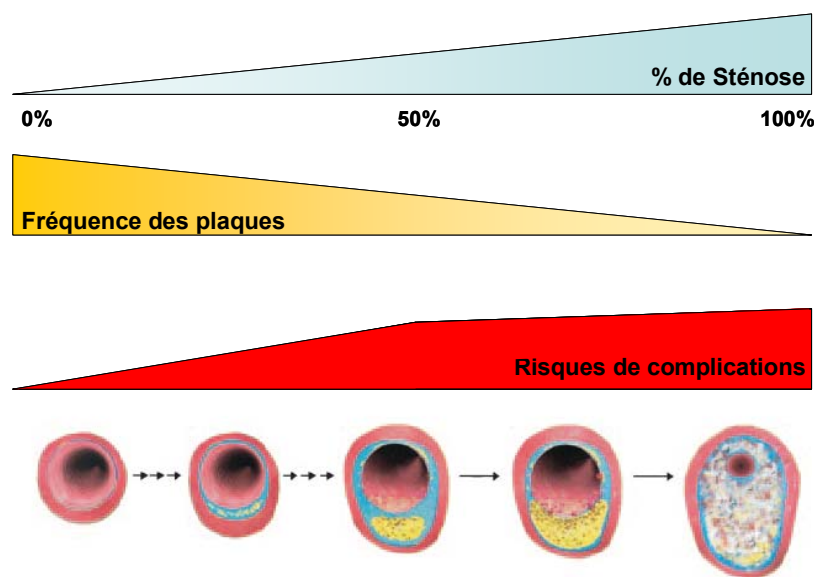


Figure 21. Corrélation entre la fréquence des plaques, leur degré de sténose et leur risque de complications (Naghavi 2003).

VI. Les facteurs de risque qui vulnérabilisent la plaque

La plaque d'athérome peut donc évoluer vers un état fibreux et stable généralement asymptomatique. Toutefois la plaque fibreuse peut devenir sténosante et symptomatique, elle est alors aisément détectable par la coronarographie et peut être traitée par angioplastie. La plaque d'athérome peut également évoluer vers une plaque vulnérable instable. C'est la rupture de ce type de plaque qui est responsable de la plupart des infarctus du myocarde. Aujourd'hui l'enjeu diagnostique consiste donc à détecter les plaques vulnérables, et l'enjeu thérapeutique à les faire évoluer vers un état stable (Figure 22).

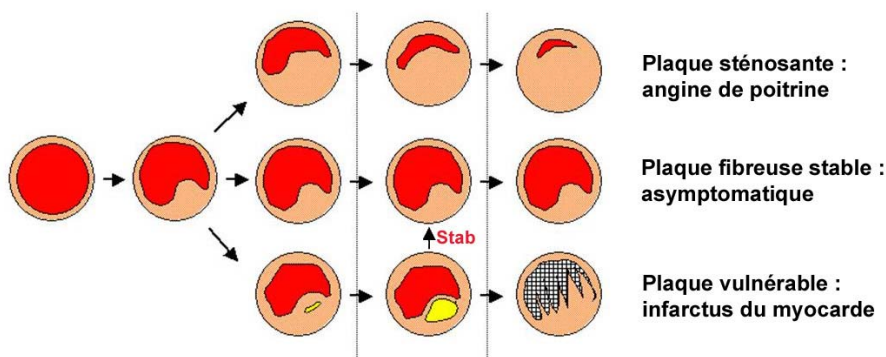


Figure 22. Plaque fibreuse et plaque vulnérable.

Sous l'effet des différents facteurs de risque, la plaque d'athérome devient vulnérable. Les traitements de l'athérosclérose consistent donc à stabiliser les plaques (Stab), c'est-à-dire à les faire évoluer d'un état vulnérable instable à un état fibreux stable.

Il existe de nombreux facteurs de risque favorisant l'évolution de la plaque d'athérome vers la plaque vulnérable. Ainsi l'hypertension artérielle, le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité et l'insulino-résistance sont des pathologies qui favorisent l'évolution de l'ensemble des plaques d'athérome d'un individu vers un état d'instabilité. Il en est de même pour certains facteurs environnementaux tels que le tabac, la sédentarité ou une alimentation inadaptée riche en graisse (Tableau 4).

Facteurs génétiques
Taux élevé de LDL et VLDL
Taux faible de HDL
Taux élevé de Lipoprotéine (a)
Hypertension
Diabète
Sexe masculin
Taux élevé d'homocystéine
Taux élevé de molécules hémostatiques (ex. : fibrinogène)
Syndrome métabolique
Insulino-résistance
Obésité
Antécédents familiaux
Facteurs environnementaux
Tabac
Sédentarité
Régime alimentaire gras
Agents infectieux

Tableau 4. Principaux facteurs de risque dans le développement de l'athérosclérose (Glass 2001).

A. L'hypercholestérolémie

Le taux de cholestérol plasmatique est un facteur majeur de risque de maladie cardiovasculaire. Parmi les nombreux facteurs de risque génétiques et environnementaux impliqués dans l'athérosclérose, l'élévation du taux de cholestérol est le seul à pouvoir induire le développement de la plaque, même en l'absence de cofacteurs (Glass 2001). Le rôle du cholestérol dans le développement et la rupture de la plaque d'athérome a été décrit dans les chapitres précédents. En résumé, les LDL oxydées semblent être le principal élément

pathogène responsable de l'initiation et du développement de l'inflammation chronique qui caractérise les plaques vulnérables. L'accumulation des LDL au sein de la paroi vasculaire et leur oxydation est toxique pour l'ensemble des cellules vasculaires. Elles sont responsables de la formation et de l'apoptose des cellules spumeuses et de la formation du corps lipidique et nécrotique instable.

B. Le diabète

Les complications cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité des individus diabétiques. L'étude de Framingham indique que le risque relatif de mortalité coronarienne chez les diabétiques, comparé à celui des sujets non diabétiques, est de 1,7 chez les hommes et 3,3 chez les femmes, quel que soit le type de diabète (Kannel 1979). Il existe de nombreux liens entre le diabète et l'athérosclérose. Ainsi, de nombreuses molécules pro-inflammatoires sont produites lors du diabète, tel que le TNF γ libéré par le tissu adipeux ou encore l'IL-6 et la CRP. Le diabète est responsable d'un ensemble d'altérations de l'endothélium (Figure 23), des cellules musculaires lisses et des plaquettes, qui favorisent le développement de l'athérosclérose. Les individus diabétiques ont souvent un taux plasmatique de LDL normal ou peu augmenté, un taux de HDL diminué et un taux de triglycérides augmenté (Fredenrich 2000). De plus, même lorsque le taux de LDL est normal, des perturbations qualitatives sont observées : prépondérance des LDL petites et denses moins bien reconnues par les LDL-R qui s'accumulent plus facilement dans les macrophages, glycation de l'apoB qui altère sa liaison avec son récepteur, oxydation des LDL (Toussaint 2003).

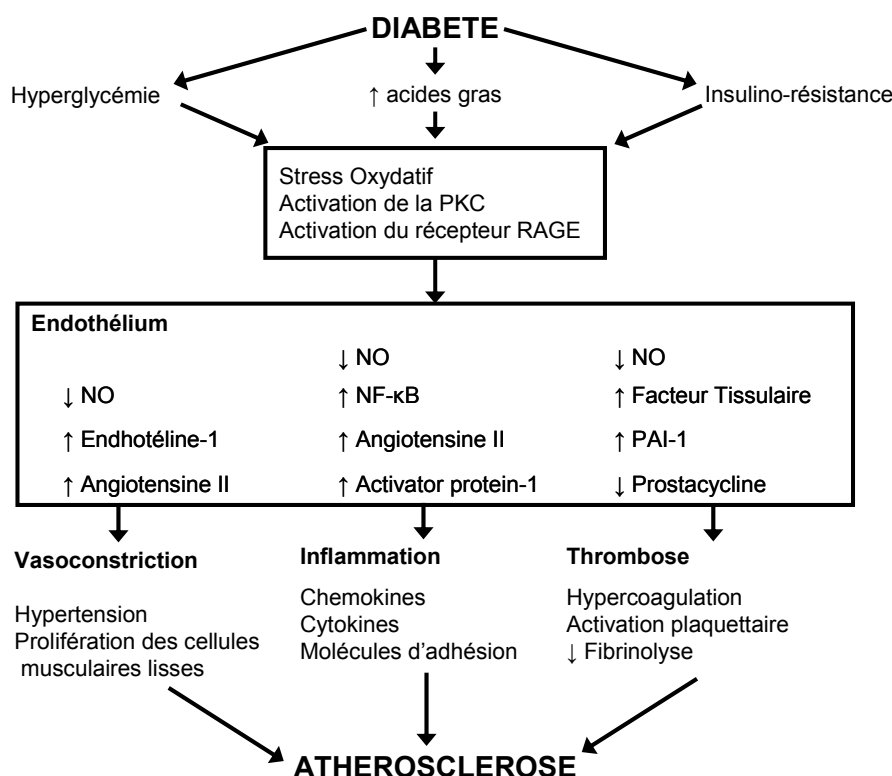


Figure 23. Le diabète, facteur de risque de l'athérosclérose (Beckman 2002).

Dans le diabète, l'hyperlipidémie, l'augmentation du taux d'acides gras et l'insulino-résistance engendrent un dysfonctionnement de l'endothélium qui favorise l'athérosclérose (RAGE : receptor for advanced glycation end product ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1).

C. Le tabac

L'oxyde de carbone favorise l'hypoxie de l'intima des artères et l'accumulation des LDL. La fumée du tabac exerce également un effet toxique direct sur l'endothélium, entraînant des anomalies de la vasomotricité ainsi qu'une augmentation des radicaux libres qui favorisent l'oxydation des LDL. Le tabac est également un puissant facteur thrombogène favorisant l'activation plaquettaire et la libération de thromboxane A2. De plus, la nicotine favorise la libération de catécholamines qui entraînent une hypertension artérielle. Enfin, le tabagisme est associé à une baisse du taux de HDL (Herpin 2003, Toussaint 2003). Ainsi, le tabac est un facteur de risque important qui multiplie par 2 le risque d'accident coronaire fatal sur 10 ans (Conroy 2003).

VII. Stabiliser la plaque d'athérome vulnérable

L'enjeu majeur dans la prise en charge de la plaque d'athérome consiste à diagnostiquer au sein de la population les individus porteurs de plaques d'athérome vulnérables. En effet, la formation des plaques d'athérome est un phénomène très précoce qui débute au stade fœtal, et chaque individu adulte possède des plaques d'athérome. Cependant la plupart des plaques sont stables et asymptomatiques. Il est donc essentiel de pouvoir discriminer les patients à risque, d'autant plus que des thérapeutiques efficaces sont à présent disponibles pour stabiliser les plaques, c'est-à-dire pour faire évoluer la plaque vulnérable instable vers la plaque fibreuse stable.

A. Mesures hygiéno-diététiques

L'obésité et la sédentarité constituent deux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Un régime alimentaire riche en fruits et légumes, l'exercice et la cessation de la cigarette constituent donc des mesures simples pouvant permettre de réduire de 80% le risque d'accident coronaire (Yusuf 2004).

L'exercice physique réduit de nombreux facteurs de risque cardiovasculaires en prévention primaire comme en prévention secondaire. Il permet de réduire statistiquement le nombre d'incidents cardiovasculaires. Il diminue notamment l'hypertension artérielle, l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose, l'élévation du taux de triglycérides, la baisse du taux de HDL et l'obésité (Thompson 2003). Une analyse regroupant 4700 patients indique que l'exercice entraîne une élévation du taux de HDL de 4,6 %, une réduction du taux de triglycérides de 3,7 % et une réduction du taux de LDL de 5,0 % (Leon 2001).

Les recommandations nutritionnelles en prévention cardiovasculaire sont les suivantes :

- Réduire la consommation de graisses saturées.
- Consommer régulièrement poissons et volailles.
- Consommer quotidiennement céréales, fruits et légumes.
- En cas d'hypertension, réduire la surcharge pondérale, limiter l'alcool, majorer les apports en calcium et potassium (Herpin 2003).

- Les consommations d'alcool modérées (10 à 30 g/j chez l'homme et 10 à 20 g/j chez la femme) réduisent la mortalité cardiovasculaire et les consommations importantes sont associées à une mortalité importante.

B. Les pharmaceutiques

1. Traitements actuels

1.1 Les Statines

Parmi les nombreux facteurs de risque génétiques et environnementaux impliqués dans l'athérosclérose, l'élévation du taux de cholestérol est le seul à pouvoir induire le développement de la plaque, même en l'absence de cofacteurs (Glass 2001). Les statines, introduites à la fin des années 80, sont de puissants hypocholestérolémiants qui réduisent la morbidité et la mortalité liées aux pathologies coronaires en première comme en seconde intention (Vaughan 2000, Vaughan 2003). Ces molécules inhibent la 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA), enzyme clef de la synthèse du cholestérol (Figure 24). Il en résulte une diminution de la production hépatique de LDL, entraînant une augmentation compensatrice de l'expression des récepteurs aux LDL par le foie et une diminution du taux de LDL circulantes (Libby 2003).

L'effet bénéfique du traitement de l'hypercholestérolémie a été mis en évidence par le traitement aux statines, en prévention primaire comme en prévention secondaire.

En prévention primaire :

- dans l'étude WOSCOPS (Sheperd 1995), le traitement par la pravastatine de 1000 patients durant 5 ans a permis d'éviter en moyenne par rapport au placebo :

- 24 infarctus du myocarde mortels ou non mortels.
- 8 pontages ou angioplasties coronaires.
- 9 décès toutes causes confondues.

Après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire (après un suivi de 6 mois supplémentaires), ce traitement a permis d'éviter en moyenne 12 décès, $p = 0,015$).

En prévention secondaire :

- dans l'étude 4S (1994), réalisée avec la simvastatine, le traitement de 1000 patients pendant 5,4 ans a évité en moyenne par rapport au placebo :

- 1 décès toutes causes confondues chez 33 patients.
- 1 événement coronarien fatal ou non fatal chez 86 patients.

- dans l'étude LIPID (1998), effectuée avec la pravastatine, le traitement de 1000 patients durant une période de 6,1 ans a permis d'éviter en moyenne 35 événements coronaires graves et 9 Accidents Vasculaires Cérébraux.

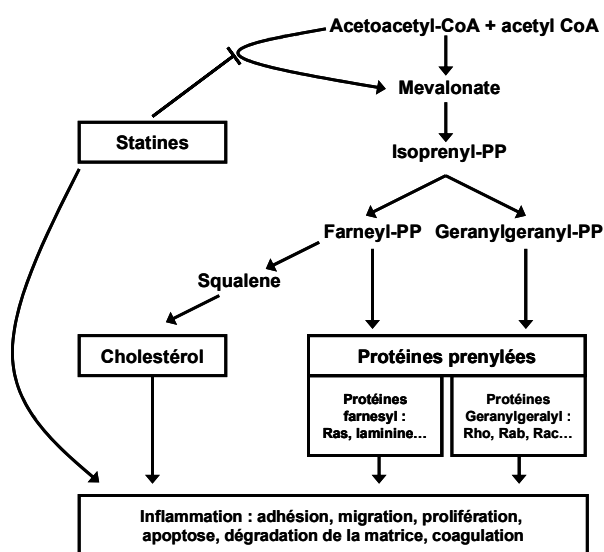


Figure 24. Implication des statines dans la voie du mévalonate lors de l'athérosclérose (Schönbeck 2004).

Néanmoins, il a été démontré lors de l'étude MIRACL que les statines peuvent exercer un effet bénéfique dans le traitement de l'athérosclérose même chez des patients avec un faible taux de LDL circulantes (Schwartz 2001). Ceci est en partie expliqué par le fait que les statines exercent des effets pléiotropiques. L'inhibition de l'HMG-CoA entraîne une inhibition de la synthèse du L-mévalonate qui, en plus de l'inhibition de la synthèse du cholestérol, inhibe la synthèse d'autres isoprénoïdes, dont le farnésyl-pyrophosphate (FPP) et le geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP). Le FPP et le GGPP sont responsables de la modification de nombreuses molécules dont les protéines ras et rho. Les GTPases de la superfamille Ras, incluant ras et rho, représentent un groupe de plus de cinquante protéines impliquées dans le contrôle de nombreuses fonctions essentielles de la cellule telles que la prolifération cellulaire, la différenciation, la morphologie, l'adhérence, l'expression génique

et le transport intracellulaire. Les statines provoquent l'accumulation de ras et rho dans le cytoplasme sous leur forme inactive (Kwak 2003). Cet effet sur le FPP et le GGPP est responsable d'une inhibition de la croissance, de la prolifération et de la migration cellulaire ainsi que d'une inhibition du stress oxydatif (Figure 24).

Ainsi, parmi tous les effets recensés dans le tableau 5 (Schoënbeck 2004), certains sont directement attribuables à la diminution du taux de LDL immunogènes. Afin d'apprécier les effets propres à une diminution du taux plasmatique du cholestérol, des études ont comparé l'évolution des plaques d'athérome sur un modèle de lapin avec une déendothélialisation de l'aorte associée à un régime hyperlipidémique en fonction du maintien ou de l'arrêt du régime après l'établissement des lésions. Ces études indiquent que l'abaissement du taux de cholestérol exerce à lui seul un grand nombre d'effets anti-inflammatoires et modifie la composition et la biologie des plaques (Figure 25). Cependant des effets anti-inflammatoires liés à l'action des statines sur la FPP et la GFPP indépendamment de la diminution du taux de cholestérol ont été mis en évidence *in vitro*, *in vivo* et lors d'études cliniques. Ainsi, Jialal et al. ont montré que le taux plasmatique de CRP, le principal marqueur de l'inflammation, était significativement diminué chez les patients traités aux statines et que cette diminution n'était pas liée à la réduction du taux de cholestérol (Figure 26) (Jialal 2001).

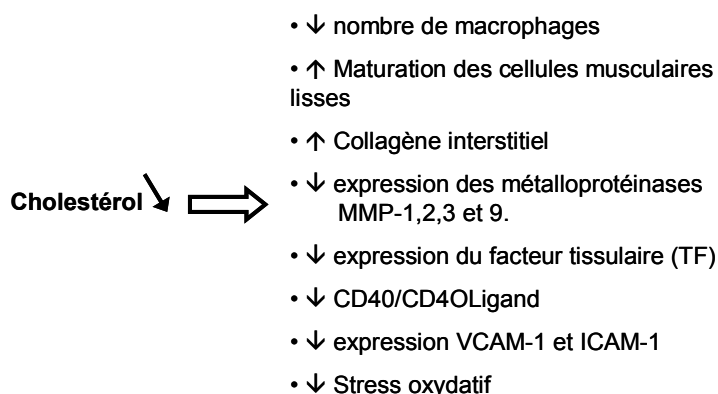


Figure 25. La diminution du taux de cholestérol modifie par elle-même la biologie de la plaque (Libby 2003).

Effet	Mediateur	Cible
↓ Adhésion	↓ MAC-1 ↓ LFA-1 ↓ ICAM-1 ↓ VCAM-1 ↓ E-Selectine ↓ L-Selectine	Macrophages et LT au niveau de l'endothélium
↓ Migration	↓ MCP-1 ↓ Il-8 ↓ RANTES	CE, Macrophages, LT
↓ Prolifération	↓ CML ↓ CE	CE, CML, Macrophages
↑ Fonction endothéliale	↑ eNOS ↓ Oxydation LDL ↓ Endotheline 1	CE
↓ Dégradation de la matrice	↓ Collagénases MMP-1/-13 ↓ Gélatinase MMP-2/-9 ↓ Stromelysine MMP-3 ↑ TIMP-1	CE, Macrophages
↑ Apoptose	↑ Caspase-3 ↑ Caspase-9 ↓ prenylation de P21 RhoB ↓ BCl-2	CE, CML, Macrophages
↓ Thrombose	↓ Tissue factor ↓ Facteur VIIa ↓ t-PA ↓ Aggrégation plaquettaire ↑ Fibrinogène ↑ PAI-1 ↑ PGI2 ↓ TxA2, TxB2	CE, Macrophages, Plaquettes, Sang
↓ Médiateurs de l'inflammation	↓ CD40/CD40L, CD40Ls ↓ Il-1β ↓ Il-6 ↓ TNF-α ↓ CRP ↓ Cyclooxygénase 2 ↓ Sérum Amyloïde A ↑ PPAR-γ ↓ Th1 (IFN-γ, Il12) ↑ Th2 (Il4, Il10, TGF-β) ↓ CMH II	CE, Macrophages, Sang

Tableau 5. Effet des Statines sur les phénomènes inflammatoires (Schoenbeck 2004).

CE : Cellule Endothéliale. CML : Cellule Musculaire Lisse. LT : Lymphocyte T. ENOS : Endothelial Nitric-Oxide Synthase. ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1. IL-8 : Interleukine-8. LDL : Low-Density Lipoprotein. LFA-1 : Leukocyte-Function Antigen-1. MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1. CMH II, Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II. MMP : Matrix Metalloproteinase. PAI : Plasminogen Activator Inhibitor-1. PGI2 : Prostaglandine I2. PPAR-γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ. RANTES : Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted. CD40Ls : CD40L soluble. VCAM-1 : Vascular Adhesion Molecule-1. TGF-β : Transforming Growth Factor-beta. TIMP-1 : Tissue Inhibitors of Metalloproteinase. TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha. t-PA : Tissue Plasminogen Activator. TxA2 : Thromboxane A2.

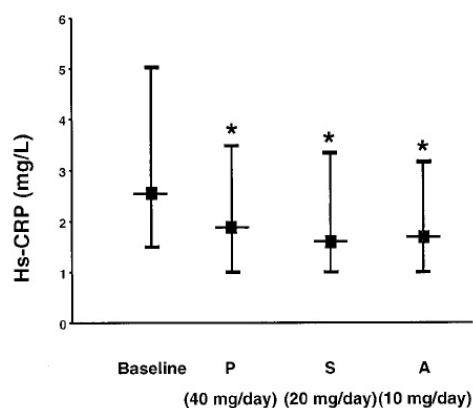


Figure 26. Effet de 3 statines sur le taux de CRP. P : pravastatine, S : simvastatin, A : atorvastatin. *P < 0,025 vs taux de base (baseline) (Jialal 2001).

1.2 Les hypotenseurs

L'hypertension est un facteur de risque de l'athérosclérose. Chez les sujets hypertendus, l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine diminue la pression artérielle et réduit la progression de l'athérosclérose. La rénine, d'origine rénale, agit sur l'angiotensinogène pour produire l'angiotensine I, qui à son tour est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'angiotensine II induit la vasoconstriction des vaisseaux mais également la migration, la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses, la formation de la matrice extracellulaire, la production de métalloprotéinases, de thromboxane A₂ et d'Il-6. En conséquence, non seulement l'angiotensine II augmente la pression sanguine mais elle est également responsable d'hypertrophie et de remodelage vasculaire qui favorise le développement et la rupture de la plaque (Schieffer 2003). L'ACE est exprimée à la base des plaques d'athérome contenant des macrophages. Chez l'homme, son activité est plus importante au niveau des plaques d'athérome vulnérables qu'au niveau des plaques stables (Hoshida 2001).

Les inhibiteurs de l'ACE exercent donc des effets pléiotropiques. Des études cliniques indiquent qu'ils réduisent la survenue d'événements coronariens (Flather 2000) et cela même chez des patients présentant une pathologie coronaire associée à une pression artérielle normale (Nissen 2004).

Les β -bloquants ont également montré de bons résultats. Ces molécules sont des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques. En plus de leur effet hypotenseur, ces molécules peuvent également exercer un effet bénéfique dans la stabilisation des plaques d'athérome en abaissant

la fréquence cardiaque par leur effet antagoniste de l'innervation cardiaque sympathique (Chiong 2003).

1.3 Les anti-thrombotiques

Les antithrombotiques les plus utilisés sont l'aspirine, le dypiridamole et les thiénoxyridines. L'aspirine bloque la synthèse des prostanoïdes cycliques (thromboxane, prostacycline et autres prostaglandines) en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase (COX). L'inhibition de la COX par l'aspirine est réalisée par une acétylation non réversible de la COX sur une sérine (Aa 530 pour la COX-1 et 516 pour la COX-2). En inhibant la synthèse de thromboxane, l'aspirine empêche ainsi l'amplification de la réaction plaquettaire. De plus, l'effet anti-inflammatoire de l'aspirine pourrait également être bénéfique pour la stabilisation de la plaque d'athérome vulnérable. Cependant, deux études récemment mises en œuvre pour évaluer cet effet n'ont pas mis en évidence de diminution de la mortalité chez les sujets traités (Schieffer 2003).

Le dypiridamole a une action sur la dilatation coronarienne, une action anti-agrégante et inhibe également l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire (Drouet 1999).

Les thiénoxyridines, ticlopidine et clopidogrel, agissent aussi sur la voie d'activation des plaquettes liée à l'ADP, mais plus en amont. Elles bloquent, de manière irréversible, les récepteurs P2Y1 à l'ADP présents sur les plaquettes et nécessaires à leur activation (Lecompte 1999).

2. Les nouvelles cibles

2.1 Les PPARs

Les « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors » (PPAR) sont des récepteurs nucléaires qui constituent une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'athérosclérose. Les PPAR (α , γ et β/δ) sont des récepteurs aux acides gras. Après leur activation par liaison avec leurs ligands, les PPAR forment des hétérodimères avec les récepteurs nucléaires au rétinoïde X et se lient au niveau d'éléments de réponse des PPAR, les PPRE, dans les régions promotrices de différents gènes afin de les activer. Les PPAR peuvent également réprimer l'expression de différents gènes soit par une liaison à l'ADN après liaison à des co-

répresseurs, soit sans se lier à l'ADN mais en interférant avec d'autres voies de signalisation (Figure 27).

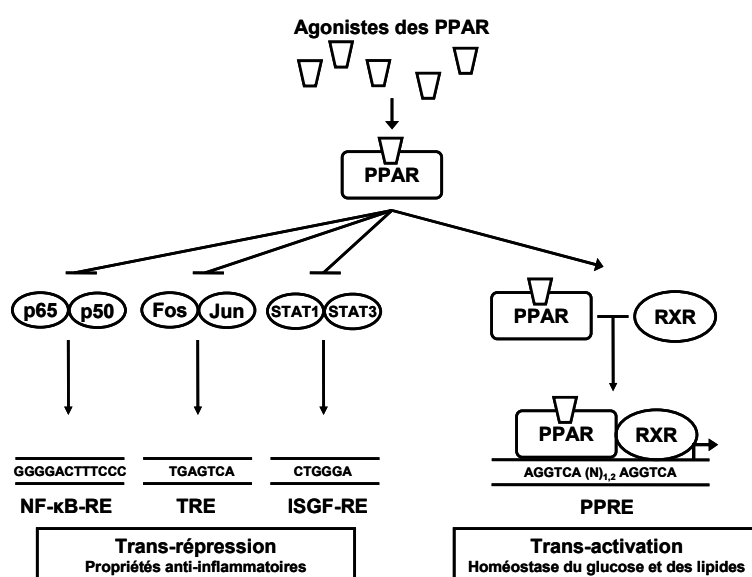


Figure 27. Action des PPAR dans les cellules vasculaires (Marx 2004).

Après activation par leur ligand, les PPAR forment des hétérodimères et activent un grand nombre de gènes comme par exemple les gènes qui contrôlent le métabolisme des lipides et du glucose. Ils peuvent également interagir avec d'autres facteurs de transcription et inhiber des gènes pro-inflammatoires.

Les thiazolidinediones (TZD) (troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone), utilisées dans le traitement du diabète de type 2 comme sensibilisateurs à l'insuline, sont des activateurs des PPAR γ . Les fibrates (fenofibrate, gemfibrozil) quant à eux sont des activateurs des PPAR α .

Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T expriment toutes des PPAR α et γ .

Les agonistes des PPAR α inhibent le facteur nucléaire NF- κ B et l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales. Ils exercent également un effet vasoprotecteur en augmentant l'expression de la NO-synthase par les cellules endothéliales, favorisent la ressortie du cholestérol non-estérifié des macrophages et réduisent l'expression du facteur tissulaire et des métalloprotéinases de la matrice.

Les agonistes des PPAR γ inhibent la production d'interferon- γ et réduisent l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et de la E-Sélectine des cellules endothéliales. Ils inhibent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, leur production de MMP et l'expression des récepteurs à l'angiotensine I et II. Au niveau des macrophages, ils exercent un effet anti-

inflammatoire en inhibant l'expression de la NO-synthase inductible, du récepteur scavenger A, de la gélatinase B (MMP9) et de cytokines. Certains effets délétères ont également été décrits, tel que l'expression du récepteur scavenger CD36, mais globalement les modèles animaux indiquent que les agonistes des PPAR γ exercent un effet bénéfique sur la stabilisation de la lésion athéromateuse (Figure 28).

Enfin, l'activation des PPAR α et γ favorise l'efflux du cholestérol des macrophages en activant notamment l'expression de « l'ATP-Binding Cassette Transporter A1 » (ABCA1), une protéine plasmique qui facilite le transport du cholestérol non estérifié des cellules vers les HDL (Glass 2001, Chinetti 2003, Marx 2004).

L'utilisation des TZD et des fibrates, seuls ou en combinaison, est donc envisagée dans le cadre du traitement de l'athérosclérose (Chinetti 2003, Marx 2004).

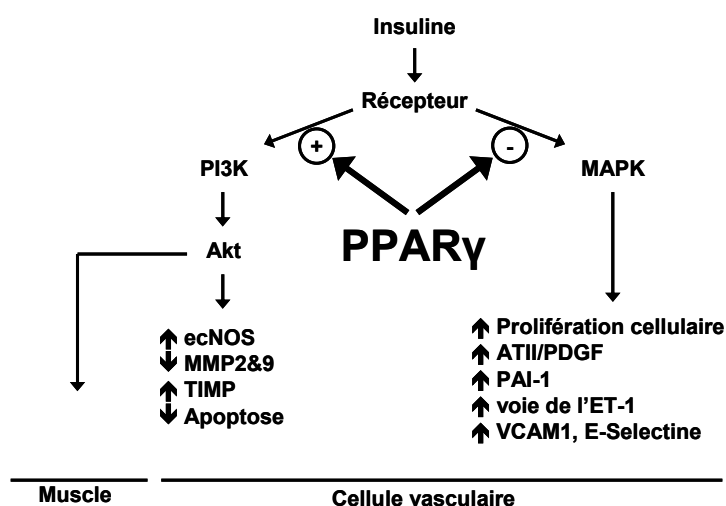


Figure 28. Action des PPAR γ sur les cellules vasculaires (Marx 2004).

Les PPAR γ modulent les voies de l'insuline. L'insulino-résistance vasculaire est caractérisée par une inhibition de la voie de la Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) accompagnée par une suractivation de la voie de la « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK). L'inhibition par les PPAR γ de cette voie de la MAPK exerce de nombreux effets anti-inflammatoires : effet anti-thrombotique par inhibition du « Plasminogen Activator Inhibitor 1 » (PAI-1), effet hypotenseur par inhibition de l'Angiotensine II (ATII) et du « Platelet-Derived Growth Factor » (PDGF), inhibition de l'Endothéline 1 (ET-1) et des molécules d'adhésion VCAM-1 et E-sélectine. De plus l'action des PPAR γ sur la voie de la PI3K stimule la NO synthase endothéliale (ecNOS), inhibe l'expression des métalloprotéinases 2 et 9, active l'inhibiteur de ces MMP (TIMP) et inhibe l'apoptose.

2.2 Les récepteurs nucléaires X

Les récepteurs hépatiques X_α et X_β (LXR : Liver X Receptor) sont des récepteurs nucléaires récemment découverts (Mangelsdorf 1990). Comme les PPAR, ils forment des hétérodimères avec les récepteurs au rétinoïde X (RXR) et activent un grand nombre de gènes. Il a été montré que les LXR participent à la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Ces LXR vont notamment induire l'expression de ABC-A1, ainsi que celle de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) et de la protéine de transfert du cholestérol estérifié, deux autres enzymes essentielles aux HDL pour transporter le cholestérol des tissus vers le foie. Le développement d'agonistes du LXR ou du RXR pourrait donc apporter de nouveaux médicaments dans le traitement de l'athérosclérose (Repa 2002).

VIII. Diagnostiquer la plaque d'athérome vulnérable

A. Evaluation du risque biologique

Les taux de cholestérol total, de LDL et de HDL constituent les principaux facteurs de risque des incidents cardiovasculaires. Associés aux autres facteurs de risque dans un système d'équations, ils permettent d'obtenir un index de risque global (Wilson 1998). De nouveaux dosages ont fait leur apparition avec l'évolution des connaissances sur la plaque d'athérome et le concept de la plaque vulnérable. En effet, l'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une pathologie inflammatoire chronique généralisée, et la notion de « sang vulnérable » a été introduite (Naghavi 2003). Ce « sang vulnérable » transporte des molécules pro-inflammatoires, issues ou non de lésions athérosclérotiques, qui favorisent l'évolution de l'ensemble des plaques d'athérome vers la vulnérabilité. Parmi ces marqueurs potentiels, on distingue la « C-reactive protein » (CRP), l'interleukine 6 (IL6), ainsi que ICAM-1 sous sa forme soluble (Nakamura 2004). Le dosage de la CRP est particulièrement intéressant puisque cette protéine constitue un facteur de risque indépendant après ajustement aux facteurs de risque définis dans l'étude de Framingham (Anand 2004, Wilson 1998). Par ailleurs, d'autres facteurs de risque circulants ont pu être identifiés tels que la lipoprotéine (a) et l'homocystéine (Fruchart 2004, Carmena 2004).

Ces dosages simples permettent d'identifier au sein de la population les individus à risque. Les personnes identifiées à risque ne développent pas toutes pour autant des plaques d'athérome vulnérables. En effet, les scores de risque basés sur les dosages sanguins constituent de très bons facteurs pronostiques à l'échelle d'une population mais leur pouvoir prédictif positif est faible pour un individu donné. Il est donc nécessaire de dépister de manière simple et non-invasive la présence de plaques d'athérome vulnérables chez les individus diagnostiqués à risque (Figure 29). Si toutefois cet examen d'imagerie non-invasive n'était pas suffisant pour établir le diagnostic, un examen d'imagerie invasive peut être envisagé.

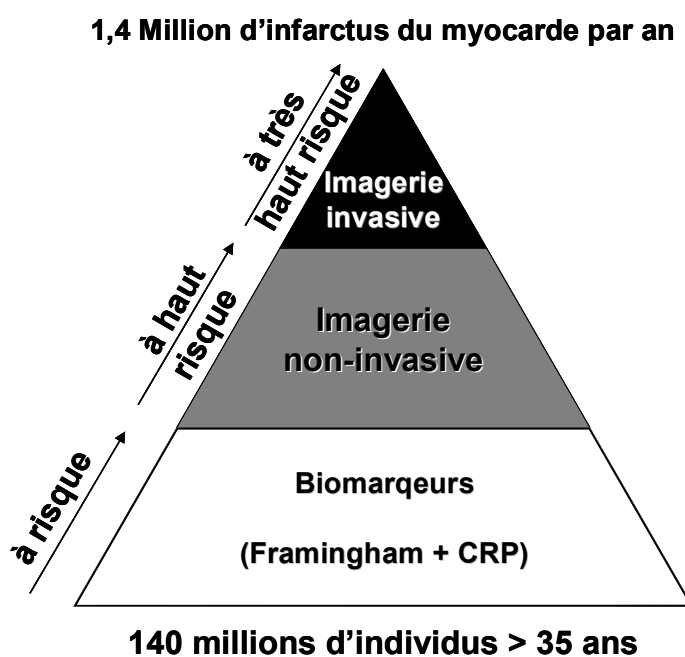


Figure 29. Diagnostiquer les patients à très haut risque.

Le programme SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education) aux Etats-Unis a pour but de détecter au sein d'une large population les individus concernés par des plaques d'athérome vulnérables, tout d'abord à l'aide de l'évaluation des facteurs de risque cliniques et des dosages biologiques, puis à l'aide de l'imagerie non-invasive et enfin, si nécessaire, de l'imagerie invasive (<http://www.vp.org>).

B. L'imagerie de la plaque d'athérome

De nombreuses modalités d'imagerie ont été ou sont actuellement développées pour détecter les plaques d'athérome vulnérables. Parmi ces techniques, on distingue d'une part les **techniques invasives** telles que l'angiographie par rayons X, l'angioscopie, l'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS), l'élastographie, la tomographie par cohérence optique

(OCT), la thermographie, la spectroscopie Raman proche infra-rouge (NIR) et en fluorescence, l'imagerie par résonance magnétique intravasculaire et l'imagerie intravasculaire en médecine nucléaire (MacNeill 2003). On distingue d'autre part des **techniques non invasives** telles que « l'électron-beam computed tomography » (EBCT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la médecine nucléaire (Nemirovsky 2003).

1. L'imagerie invasive

1.1 Les techniques non spectroscopiques

a. L'angiographie

(a) Principe

Développée dans les années 50, cette première technique d'imagerie *in vivo* des artères coronaires est alors devenue la méthode de référence pour le diagnostic des pathologies coronariennes. Cette méthode d'imagerie invasive repose sur l'injection d'un produit de contraste iodé, via un cathéter placé dans l'artère à explorer. Ce produit de contraste opaque aux rayons X permet l'obtention d'images radiologiques des vaisseaux.

(b) Intérêt

Cette technique permet de visualiser les sténoses et d'apprécier leur importance et leur irrégularité. Les lésions présentant des bordures irrégulières correspondent généralement à des plaques complexes associées à des hémorragies, alors que les sténoses concentriques et régulières correspondent à des plaques plus stables (Figure 30) (Levin 1982).

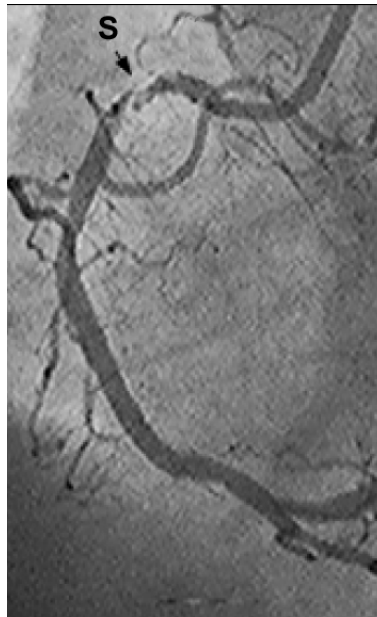


Figure 30. Exemple d'image obtenue en angiographie (Nakamura 2004). (S : Sténose).

(c) Limitations

La principale limitation de cette technique est qu'elle donne une information indirecte sur la plaque d'athérome puisqu'elle n'apporte qu'une information sur la lumière vasculaire. Or le degré de sténose n'est pas corrélé avec le risque de complications et la plupart des ischémies myocardiques sont causées par la rupture d'une plaque pas ou peu sténosante indétectable en angiographie. Ceci s'explique par le fait que les plaques vulnérables présentent souvent un remodelage positif non sténosant, alors que seules les plaques à des stades très avancés présentent un remodelage négatif qui réduit la lumière vasculaire (Glagov 1987).

b. L'angioscopie

(a) Principe

Cette technique repose sur la transmission par fibre optique de la lumière émise dans le spectre du visible. Elle apporte une information sur la couleur et la morphologie de la surface de la plaque.

(b) Intérêt

Les plaques de couleur jaune correspondent à des plaques d'athérome contenant une importante plage lipidique recouverte d'une capsule fibreuse fine. Les plaques plus fibreuses et donc plus stables présentent quant à elles une coloration blanche. La présence d'un thrombus frais (rouge) ou ancien (blanc) est également détectée par cette technique (Figure 31) (Mizuno 1991, Saltzman 2002).

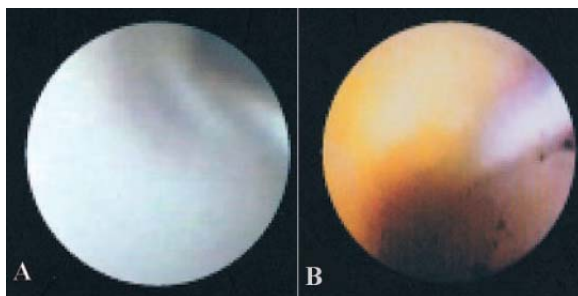


Figure 31. Exemple d'images obtenues par angiographie (MacNeill 2003).

En A : plaque fibreuse blanche. En B : plaque lipidique jaune.

(c) Limitations

Cette technique apporte une information morphologique de surface et ne permet pas d'apprécier la structure interne, ni le métabolisme de la plaque. Elle ne permet donc pas de détecter les plaques vulnérables. De plus, la circulation sanguine est un obstacle à l'obtention des images. Afin de s'en affranchir, cette technique requière des « flush » de sérum physiologique ou l'utilisation d'un ballonnet pour occlure le vaisseau en amont de la zone étudiée. Pour finir, l'interprétation des couleurs observées reste très subjective (MacNeill 2003).

c. L'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS)

(a) Principe

Une sonde intravasculaire est équipée d'un cristal piézo-électrique qui émet des ultrasons à une fréquence de 20 à 50 MHz. Les ultrasons ont la propriété de pénétrer dans les tissus. La quantité d'ultrasons absorbés et réémis vers le cristal est dépendante de la nature du tissu traversé. Ces ondes réémises permettent d'obtenir une image en niveau de gris avec une résolution axiale de 150 μm et une résolution latérale de 250 μm (Nissen 2001).

(b) Intérêt

L'IVUS permet de visualiser et de caractériser les plaques d'athérome. Une région échogène correspond à du tissu calcifié, une région hyper-échogène à du tissu fibreux et une région hypo-échogène à une zone lipidique.

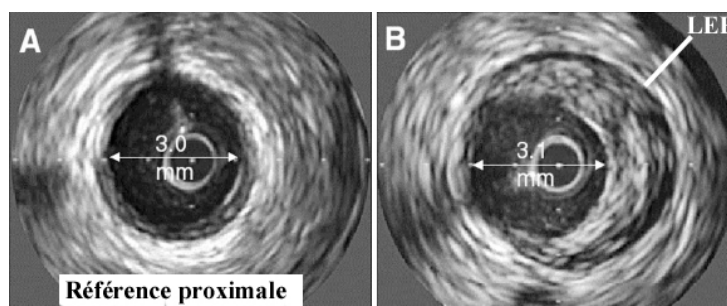


Figure 32. Exemple d'images obtenues par IVUS (Nissen 2001).

En A, une région avec une petite lésion et en B, une région plus distale sur la même artère caractérisée par un remodelage positif important. Le diamètre de la lumière vasculaire est le même en A et en B (3.0 et 3.1 mm). LEE : Limitante Élastique Externe.

L'IVUS permet de visualiser la limite sang-intima ainsi que la limitante élastique externe, ce qui permet de visualiser les plaques d'athérome qui présentent un remodelage positif invisible à l'angiographie (Figure 32) (De Franco 2001).

(c) Limitations

La sensibilité de détection des régions calcifiées est nettement supérieure à celle des régions lipidiques et fibreuses qui sont souvent difficiles à différencier. De plus, la résolution de l'IVUS ne permet pas de quantifier l'épaisseur de la capsule fibreuse, ni le degré d'infiltration des cellules immunitaires. Cette technique ne permet donc pas de diagnostiquer les plaques vulnérables. Enfin, l'interprétation des images obtenues est souvent perturbée par la présence d'artefacts, liés à la position de la sonde ou à l'apparition de zones d'ombres causées par les régions calcifiées (MacNeill 2003, Brezinski 2002).

(d) Perspectives

De nombreuses techniques ont été développées pour améliorer la détection des plaques vulnérables par IVUS. Ainsi, l'IVUS a été combinée avec une mesure d'élastographie qui

permet d'apprécier l'élasticité des tissus par l'analyse des radiofréquences ultrasonores mesurées en un même point pour différentes pressions intravasculaires lors du cycle cardiaque (Figure 33).

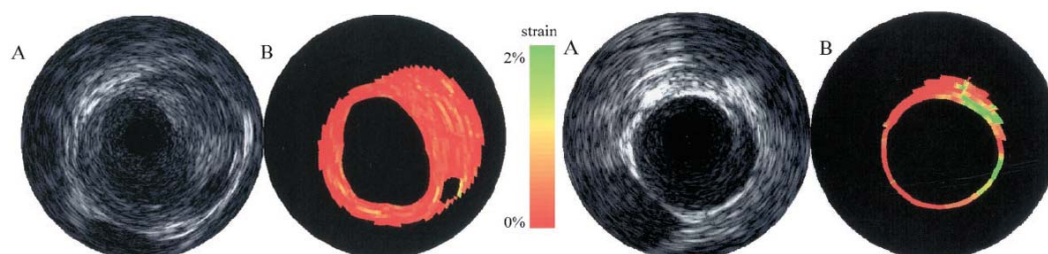


Figure 33. Exemple d'images obtenues par IVUS-Elastographie *in vivo* (DeKorte 2002).

A gauche, une plaque fibreuse par IVUS (A) présente une élasticité homogène (B). A droite, une plaque riche en lipides par IVUS (A) présente une élasticité élevée (B).

Cette technique d'élastographie intravasculaire a permis de détecter des plaques d'athérome vulnérables *ex vivo* et de différencier *in vivo* les régions lipidiques des régions fibreuses (Shaar 2003, De Korte 2002). D'autre part, des agents de contraste spécifiques d'une cible d'intérêt ont été développés afin de permettre la réalisation d'imagerie non plus uniquement morphologique, mais également fonctionnelle. Il s'agit de particules échogéniques -microbulles, liposomes ou nanoparticules de perfluorocarbones- encapsulées et recouvertes d'un ligand spécifique de la cible d'intérêt (Farouc 2004). Ainsi, sur un modèle d'athérosclérose induite chez le mini porc par déendothélialisation de l'artère carotide, des immunoliposomes échogéniques (ELIP) dirigés contre différentes cibles d'intérêt de la plaque d'athérome (VCAM-1, ICAM-1, TF, fibrine et fibrinogène) ont induit l'apparition d'un hypersignal au niveau des lésions durant les 5 premières minutes suivant leur injection (Figure 34) (Hamilton 2004).

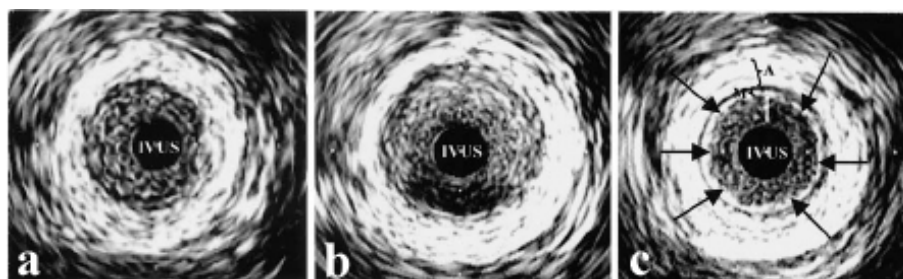


Figure 34. Utilisation d'un ELIP anti VCAM-1 en imagerie IVUS (Hamilton 2004).

Images réalisées 5 minutes après injection de : **a** sérum physiologique, **b** ELIP non couplés, **c** 5 mg d'ELIP anti VCAM-1. Les flèches indiquent un hypersignal.

d. La tomographie par cohérence optique (OCT)

(a) Principe

L'OCT mesure les échos optiques d'un faisceau infrarouge dirigé contre la paroi vasculaire. Elle permet d'obtenir des images *ex vivo* avec une très haute résolution (10 μm de résolution axiale et 20 μm de résolution latérale).

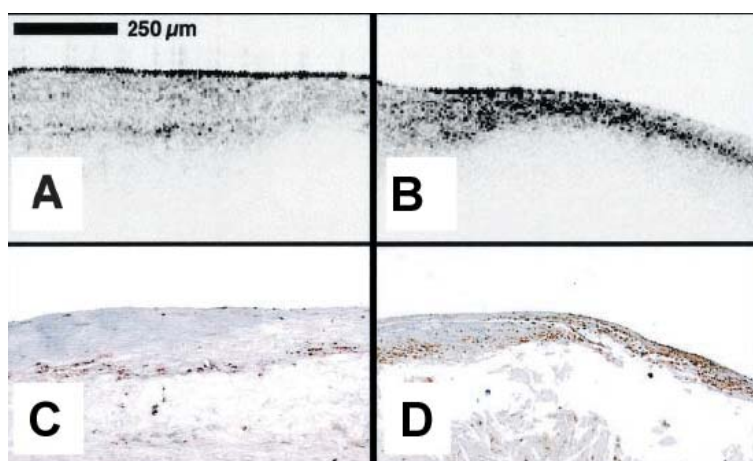


Figure 35. Exemple d'images obtenues par OCT (Tearney 2003).

A et B : OCT; C et D : immunohistochimie anti-macrophages. A et C : fibroathérome avec une faible concentration en macrophages. B et D : fibroathérome avec une forte concentration en macrophages.

(b) Intérêt

La haute résolution de l'OCT permet de caractériser très précisément la structure des plaques d'athérome. Cette résolution permet d'évaluer l'épaisseur de la capsule fibreuse ainsi que la présence de macrophages infiltrés dans la plaque (Figure 35) (Tearney 2003). Contrairement aux sondes relativement sophistiquées utilisées en IVUS, les sondes de l'OCT ne comportent pas de transducteurs et sont constituées d'une simple fibre optique de faible diamètre (<1 mm) et de faible coût. Enfin, les systèmes OCT sont compacts et portables (Brezinski 2002). *Ex vivo*, la sensibilité et la spécificité de cette technique sont élevées avec une bonne reproductibilité inter-observateurs (la sensibilité et la spécificité sont de 75% et 97% pour les plaques fibreuses, 95% et 97% pour les plaques calcifiées et 92% et 91% pour les plaques riches en lipides) (Yabushita 2002).

(c) Limitations

La principale limitation de cette technique vient du fait que le rayonnement infrarouge est peu pénétrant (1 à 2 mm) et que son absorption par les membranes des cellules sanguines est très importante. Ainsi, de même que pour l'angioscopie, cette technique nécessite l'emploi d'un ballonnet obstructif ou de « flush » de sérum physiologique (Brezinski 2002).

e. La thermographie

(a) Principe

Les plaques vulnérables sont caractérisées par des phénomènes inflammatoires importants. Ainsi, les plaques présentant une densité élevée en macrophages libèrent une quantité de chaleur relativement plus importante que les plaques non-inflammées. La mesure de la température de surface de l'artère est réalisée avec une sonde intravasculaire qui détecte des variations de 0,05°C avec une résolution spatiale de 0,5 mm (Zarrabi 2002).

(b) Intérêt

Cette technique apporte une information d'ordre métabolique sur la plaque d'athérome. L'hétérogénéité des températures est corrélée à la présence des macrophages *ex vivo* et *in vivo*. Elle est plus importante chez les patients présentant un infarctus aigu que chez des patients présentant un angor stable. Couplée à une autre modalité d'imagerie, elle pourrait aider à caractériser la plaque d'athérome vulnérable (Stefanadis 1999).

(c) Limitations

Dans une publication récente, Stefanadis et al. rapportent que chez des patients présentant un angor à l'effort, donc une sténose sévère, l'hétérogénéité de températures existe également. D'autre part, la mesure de l'hétérogénéité de températures est sous estimée *in vivo* du fait du flux sanguin qui homogénéise les températures en surface de l'artère (Stefanadis 2003).

f. Les sondes fluorescentes activables

(a) Principe

Cette technique repose sur l'injection d'un ligand fluorescent spécifique d'une cible d'intérêt de la plaque d'athérome. Les sondes activables sont également appelées sondes intelligentes : elles ne sont détectables qu'en présence de leur cible qui amplifie ou modifie le spectre d'émission du fluorochrome. La détection peut être réalisée de manière non invasive chez les petits animaux de laboratoire. Cependant, la fluorescence même émise dans le domaine du proche infrarouge ne pouvant traverser qu'une faible épaisseur de tissu, l'utilisation de sondes intravasculaires est envisagée pour le diagnostic de la plaque d'athérome chez l'homme.

(b) Intérêt

L'information apportée par cette technique d'imagerie est d'ordre métabolique. La fluorescence de la sonde étant dépendante de sa liaison avec son ligand, le rapport signal sur bruit est très élevé. Récemment, une équipe a utilisé une sonde fluorescente dans le domaine du proche infrarouge (NIRF) activable afin de visualiser l'activité protéolytique de la cathepsine-B au sein de la plaque d'athérome (Figure 36).



Figure 36. Exemple d'image obtenue par NIRF (Chen 2002).

En A, l'aorte d'une souris apoE^{-/-} : les plaques d'athérome sont colorées en rouge avec une coloration au Sudan IV. En B, sur l'image NIRF correspondante, la fluorescence est corrélée aux plaques.

(c) Limitations

Le développement de ces sondes est complexe et le nombre de cibles potentielles possédant une action enzymatique est limité (Farouc 2004).

g. L'IRM intravasculaire

(a) Principe

La technique de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) repose sur l'étude des protons placés dans un champ magnétique et soumis à un « pulse » de radiofréquence. Le réalignement des spins dans le champ magnétique, caractérisé par les mesures de relaxation T1 et T2, est dépendant de l'environnement moléculaire des protons.

(b) Intérêt

La résolution de ces sondes (160 μm) est supérieure à celle de L'IRM non invasif. Combinée à une IRM standard de 0.5 Tesla, ces sondes permettent de caractériser *ex vivo* les plaques d'athérome carotidiennes (Figure 37) (Rogers 2000).

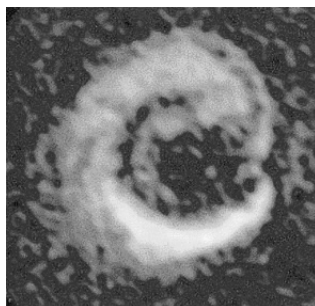


Figure 37. Exemple d'image obtenue par IRM intravasculaire (Rogers 2000).

L'hypersignal observé *ex vivo* au niveau d'une plaque d'athérome carotidienne humaine est dû à une région lipidique.

(c) Limitations

La principale limitation de cette technique provient des artefacts liés aux mouvements cardiaques et au flux sanguin qui constituent un obstacle majeur pour son utilisation *in vivo*. Des études suggèrent l'utilisation d'un ballonnet qui bloque le flux sanguin et positionne la

sonde au contact de la paroi artérielle, augmentant ainsi la résolution des images obtenues. Néanmoins, le temps d'acquisition de cette technique semble peu compatible avec cette utilisation (Zimmerman-Paul 1999, MacNeill 2003).

h. La médecine nucléaire

(a) Principe

La médecine nucléaire est une technique d'imagerie moléculaire généralement utilisée de manière non invasive. Son principe repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarqué, ou radiotraceur, spécifique d'une cible d'intérêt. L'imagerie est ensuite réalisée par détection externe de la radioactivité à l'aide d'une caméra sensible aux photons émis lors de la désintégration de l'isotope radioactif. Ainsi, on détecte les photons gamma en imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), ou les photons résultant de l'annihilation de positons en imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons).

Le faible volume des plaques d'athérome vulnérables ($<0,1 \text{ mm}^3$), associé à une fixation non spécifique et à une activité circulante du radiotraceur souvent importante, font que le rapport de détection entre la fixation spécifique et le bruit de fond est souvent insuffisant pour réaliser de l'imagerie en détection externe. Certaines équipes envisagent donc d'utiliser des sondes intravasculaires.

(b) Intérêt

Parmi les différentes particules émises lors des désintégrations radioactives, les particules chargées (électrons ou positons) ont un trajet relativement court (quelques millimètres) en comparaison de celui des photons qui sont utilisés pour l'imagerie en détection externe. Or, cette profondeur est suffisante pour permettre l'exploration de l'intégralité de la plaque d'athérome à condition que la sonde de détection soit placée à son contact. La mise au point d'une sonde intravasculaire sensible aux particules chargées devrait donc permettre d'améliorer le rapport de détection entre la fixation spécifique et le bruit de fond en limitant la profondeur de tissu exploré. D'autre part, la résolution obtenue avec ce type de sondes pourrait être meilleure que celle obtenue en détection externe (Strauss 2000).

Une première étude a été réalisée à l'aide d'une sonde sensible aux positons. En imagerie externe en TEP ce sont les photons résultants de l'annihilation de ces positons après un trajet

de 1 à 2 mm qui sont détectés. La détection directe des positons devrait donc permettre de limiter la profondeur d'exploration en imagerie *in vivo* et pourrait également permettre d'améliorer la résolution. Dans cette étude préliminaire réalisée *ex vivo* chez le lapin au niveau de l'artère iliaque, le radiotracteur émetteur de positon évalué est le [^{18}F]-fluorodéoxyglucose (FDG). Le FDG est un analogue du glucose qui s'accumule dans les macrophages recrutés dans la plaque d'athérome vulnérable. L'activité mesurée à l'aide de cette sonde au niveau des lésions athérosclérotiques est 4,8 fois plus élevée que celle mesurée au niveau des zones saines après correction du bruit de fond (Lederman 2001). Une sonde sensible aux électrons bêta et aux électrons de conversion a été évaluée par Janecek et al. Elle possède une résolution de 6,7 mm et un champ de vue de 4 mm². La sensibilité de la sonde ainsi que la pénétration du rayonnement bêta dépendent de l'isotope utilisé. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des émetteurs β purs tels que le ^{204}Tl (Figure 38) (Janecek 2004).

(c) Limitations

La mise au point de ces sondes n'est pas achevée. Le diamètre de la sonde sensible aux positons utilisée par Lederman et al. est de 3 mm, or le diamètre des sondes intravasculaires devrait être de l'ordre de 1 mm afin de pouvoir explorer l'ensemble des artères et franchir les sténoses sévères (Strauss 2000). Cette technique pourrait néanmoins devenir complémentaire de la médecine nucléaire non invasive pour la détection des plaques d'athérome vulnérables.

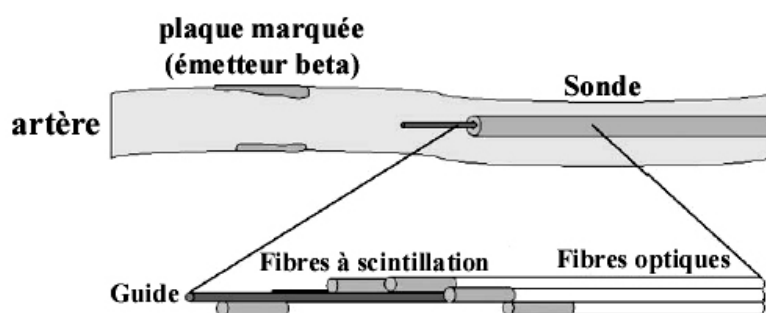


Figure 38. Représentation schématique de l'extrémité de la sonde sensible aux électrons (Janecek 2004).

Les électrons excitent le cristal scintillant long de 6 mm situé à l'extrémité des fibres et le photon émis est guidé par une fibre optique (1,5 mètres) vers une interface reliée à un ordinateur. Les différentes fibres sont décalées de 6 mm et le champ de vue est de 4 cm.

1.2 Les techniques spectroscopiques

Ces techniques reposent sur l'analyse des spectres d'émission et d'absorption d'une source lumineuse par un tissu. Dans un premier temps, une source lumineuse émet un rayonnement en direction de la paroi artérielle. Ensuite un détecteur récupère la lumière transmise ou réfléchiée par le tissu. Enfin un spectromètre analyse le spectre de ce signal qui est caractéristique du tissu traversé (Moreno 2002).

a. Spectroscopie Raman

(a) Principe

Lorsque la collision du photon lumineux avec la matière est inélastique, le rayonnement réémis a une énergie différente de l'énergie d'émission, on appelle cette émission « émission Raman ».

(b) Intérêt

Cette technique permet d'obtenir une information très précise sur la nature des tissus. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une émission dans le proche infrarouge (RAMAN-NIR). Les émissions des régions lipidiques et calcifiées sont identifiables et la spectrométrie Raman les détecte avec une grande sensibilité *ex vivo*. Des cathéters sont en cours de développement pour son utilisation *in vivo* chez l'homme (Moreno 2002).

(c) Limitations

L'utilisation de la spectrométrie Raman (RS) pose des problèmes de rapport signal sur bruit en interférant avec la circulation sanguine. De plus, la pénétration dans les tissus est faible.

b. Spectroscopie proche infrarouge (NIR)

(a) Principe

Cette technique se base sur l'étude de l'absorbance par les tissus d'une gamme de rayonnements émis dans le domaine de l'infrarouge (1000 à 2400 nm).

(b) Intérêt

Aux longueurs d'ondes choisies, l'hémoglobine et l'eau n'absorbent que très peu le rayonnement. Chaque composé organique possède un spectre spécifique, et les différents spectres peuvent être analysés en un temps très court (<1 sec). Cette technique a été utilisée pour le diagnostic des plaques d'athérome vulnérables chez l'homme post-mortem (Figure 39) (Moreno 2002, Moreno 2002⁽²⁾).

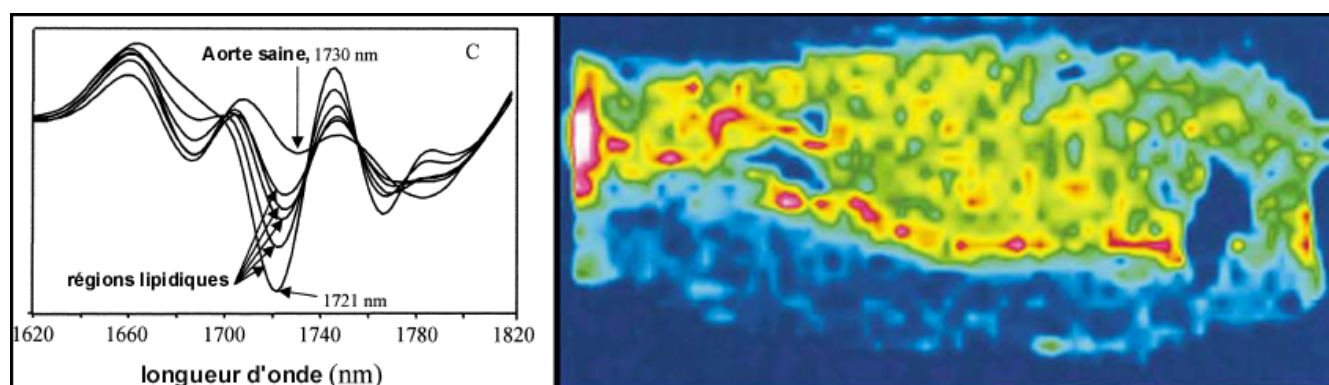


Figure 39. Exemple d'image obtenue en spectroscopie NIR (Wang 2002).

Au sein du spectre d'absorbance obtenu entre 1000 et 2400 nm certaines régions spectrales sont caractéristiques d'un composé. Sur l'exemple de gauche, les auteurs observent un décalage du spectre à 1721 nm en présence de lipides. Ces variations peuvent être traduites en échelle de couleur lors de la reconstruction de la surface de l'artère étudiée (image de droite).

Ex vivo, la sensibilité et la spécificité de cette technique sont respectivement de 90% et 93% pour la détection des plages lipidique, de 77% et 93% pour celle des capsules fibreuses fines (<65 μm), et de 84% et 91% pour la détection des cellules inflammatoires. En choisissant des longueurs d'ondes adéquates auxquelles le sang interfère peu, la détection de plaques d'athérome a été réalisée *in vivo* à travers le sang, chez le lapin. Au cours de cette étude, des plages lipidiques de 0.75 mm^2 ont pu être diagnostiquées avec une sensibilité de 78% et une spécificité de 75% (Moreno 2001).

(c) Limitations

La pénétration du proche infrarouge est relativement faible (de 0.35 mm à 2 mm en fonction de la puissance de la source infrarouge et de la longueur d'onde). La technique est actuellement en transfert pour une utilisation *in vivo*, mais le manque d'informations

morphologiques nécessitera sans doute son couplage avec l'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS) ou la tomographie par cohérence optique (OCT).

c. Spectroscopie en fluorescence

(a) Principe

Une sonde intravasculaire émet un rayonnement d'excitation et mesure les différentes énergies réémises lors de la désexcitation des différents composés excités.

(b) Intérêt

Dans la paroi artérielle, les fluorescences naturelles des régions saines, lipidiques et calcifiées en réponse à une excitation dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet diffèrent. Il est donc possible de les identifier *ex vivo* par cette technique (Moreno 2002).

(c) Limitations

In vivo, de nombreuses molécules interfèrent dans les mesures. L'hémoglobine notamment ne permet pas l'utilisation de cette technique en présence du flux sanguin (Anastassopoulou 2001).

1.3 Conclusion

Modalité	Résolution	Pénétration	Capsule fibreuse	Plaque lipidique	Inflammation	Calcium	Thrombus
IVUS	100-150 µm	+	-	+	-	+	+
Angioscopie		-	-	+	-	-	+
OCT	10 µm	-	+	+	-	+	+
Thermographie	0,5 mm	-	-	-	+	-	-
Spectroscopie		-	-	+	+	+	-
IRM	160 µm	+	-	+	+	+	+
Med. Nucl.	quelques mm	+	-	-	+	-	-

**Tableau 6. Comparaison des différentes techniques intravasculaires
(D'après MacNeill 2003).**

NB : les sondes destinées à la médecine nucléaire intravasculaire sont en développement. Dans le futur, elles devraient permettre de visualiser différentes cibles moléculaires, mais à ce jour, seule l'inflammation a été ciblée avec le FDG.

De nombreuses modalités intravasculaires sont en cours d'évaluation pour le diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable (Tableau 6). L'approche invasive optimale pourrait résulter de la combinaison d'une approche morphologique (IVUS, OCT, IRM) avec une approche métabolique ou fonctionnelle (thermographie, élastographie, spectroscopie, médecine nucléaire). Ces techniques invasives, bien que prometteuses, ne pourront toutefois pas être utilisées sur une très large population. Une technique d'imagerie non-invasive, simple et peu onéreuse, est donc indispensable pour dépister en premier les individus à haut risque au sein de la population définie comme étant à risque à l'issue de l'évaluation du risque biologique.

2. L'imagerie non-invasive

2.1 La tomographie par rayons X

a. Principe

Le scanner est une technique d'imagerie par rayons X. Les rayons X qui traversent le patient sont détectés à l'aide de récepteurs adaptés. Le scanner le plus utilisé est « l'Electron Beam Computed Tomography » ou EBCT qui utilise deux couronnes de récepteurs stationnaires. Récemment, de nouveaux détecteurs (« Multi Detector-row Computed Tomography » ou MDCT) utilisant 4 couronnes de détecteurs ou des détecteurs en spirale ont été mis au point pour réaliser de l'imagerie ultra-rapide, ce qui permet de minimiser la durée de l'acquisition et les artefacts liés aux mouvements cardiaques (Achenbach 2004). Un examen dure moins de 15 minutes. Cette technique permet de réaliser une angiographie non invasive et fournit également un score calcique coronaire quantifiable (Nemirovsky 2003).

b. Intérêt

Cette technique extrêmement rapide fournit un résultat immédiat et irradie 10 à 100 fois moins le patient qu'un examen angiographique standard. De plus, son coût est relativement faible. Cette technique détecte le calcium au niveau des artères coronaires avec une très haute sensibilité (>90%) et le score calcique obtenu est corrélé avec le risque d'incident cardiaque et avec la mortalité (Figure 40) (Nemirovsky 2003, Kondos 2003).



Figure 40. Exemple d'image obtenue avec un multidétecteur en spirale (Achenbach 2004).

Sur cette reconstruction axiale, on distingue une plaque d'athérome calcifiée en position proximale sur l'artère interventriculaire antérieure d'un patient.

c. Limitations

Cette technique est très peu spécifique pour diagnostiquer les plaques d'athérome vulnérables non calcifiées (53%) (Achenbach 2004). D'autre part, même si la présence de calcium a été décrite dans les plaques vulnérables, il est surtout présent dans les plaques stables. Cette technique n'est donc pas utilisable pour détecter les plaques d'athérome vulnérables *in vivo*.

2.2 L'IRM

a. Principe

La technique de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) repose sur l'étude des protons placés dans un champ magnétique et soumis à un pulse de radiofréquence. Le réalignement des spins dans le champ magnétique, caractérisé par les mesures des temps de relaxation T1 et T2, est dépendant de l'environnement moléculaire des protons.

b. Intérêt

De nombreuses études ont montré qu'il était possible de différencier les régions lipidiques, calcifiées, les thromboses et le collagène qui composent les plaques d'athérome carotidiennes ou aortiques en IRM conventionnelle (Toussaint 1996, Helft 2001).

c. Limitations

L'imagerie des plaques situées dans les artères coronaires est rendue difficile par les mouvements cardiaques et respiratoires, ainsi que par le trajet sinueux, le faible diamètre de ces artères et leur éloignement par rapport à la bobine. De plus, la résolution de l'IRM standard (300 μm) ne permet pas de visualiser les capsules fibreuses fines caractéristiques des plaques vulnérables (Fayad 2000).

d. Perspectives

L'une des solutions proposées afin de résoudre ce problème consiste à réaliser de l'IRM intravasculaire (Chap VIII-B-1.2-g). Une seconde solution consiste à améliorer les performances de l'IRM non invasive en améliorant la résolution des images réalisées. L'IRM haute résolution réalisée en séquence « black-blood » permet de minimiser les signaux en provenance de la circulation sanguine. Cette technique, utilisée *in vivo* chez l'homme par Fayad et al., a permis de mettre en évidence une différence significative de l'épaisseur de la paroi des artères coronaires entre des sujets sains et des sujets présentant une sténose >40% en angiographie. La résolution n'était cependant pas suffisante pour déterminer la composition des plaques (Fayad 2000). Pour finir, une troisième solution consiste à utiliser des agents de contraste afin d'obtenir une information non plus uniquement morphologique mais également fonctionnelle de la plaque. Ainsi, l'USPIO (« ultrasmall superparamagnetic iron oxide »), un agent de contraste superparamagnétique composé de particules d'oxyde de fer de très faible taille (18 nm), est phagocyté par les macrophages recrutés dans les plaques d'athérome vulnérables. Cet agent de contraste modifie le temps de relaxation T2 des protons et permet ainsi de visualiser la présence des macrophages *in vivo* chez le lapin (Figure 41) (Ruehm 2001).

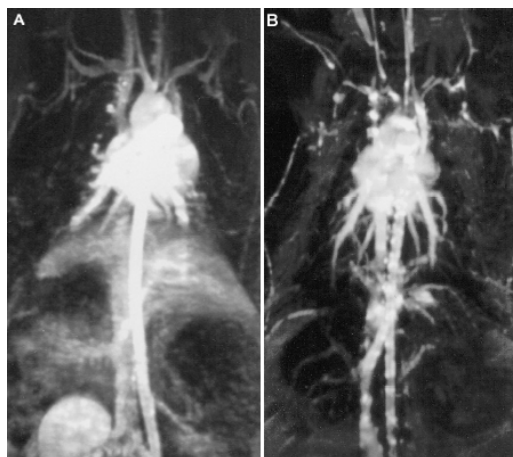


Figure 41. Exemple d'image obtenue en IRM-USPIO (Ruehm 2001).

Vue coronale de l'aorte de lapins hyperlipidémiques (WHHL). A gauche, sur l'image obtenue après injection d'un agent de contraste paramagnétique extracellulaire, l'aorte est homogène et aucune sténose n'est visible. A droite, sur l'image obtenue 5 jours après l'injection d'USPIO, les particules d'oxyde de fer captées par les macrophages sont nettement visibles dans la paroi artérielle.

Cette technique a ensuite été employée *in vivo* pour visualiser les macrophages recrutés au sein de plaques d'athérome carotidiennes chez l'homme (Kooi 2003). Des molécules paramagnétiques dirigées contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont également été utilisées pour visualiser la néovasculature au sein de la plaque d'athérome. *In vivo* chez le lapin, elles induisent une élévation de 47 ± 5 % du signal au niveau des lésions de l'aorte abdominale (Winter 2003).

2.3 La médecine nucléaire

La médecine nucléaire permet de réaliser de l'imagerie moléculaire avec une très forte sensibilité. Son principe repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarqué spécifique d'une cible d'intérêt. La localisation du radiotraceur est ensuite détectée à l'aide de caméras sensibles soit à l'émission de rayonnement gamma lorsque le radiomarquage est réalisé à l'indium 111, à l'iode 125, à l'iode 123 ou au technétium 99m, soit à l'émission de positons lorsque le radiomarquage est réalisé au fluor 18. L'image obtenue étant totalement dépendante du radiotraceur injecté et de sa cible, de très nombreuses études ont été réalisées. Elles ont pour cibles différentes molécules ou mécanismes impliqués dans la formation de la plaque d'athérome vulnérable.

a. Les lipides

L'accumulation massive des lipides dans la plaque d'athérome joue un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires ainsi que dans la formation et l'apoptose des cellules spumeuses (Ross 1999). La plaque d'athérome vulnérable est caractérisée par la présence d'une plaque lipidique et nécrotique occupant plus de 40% de son volume (Chap III B 2) (Naghavi 2003).

(a) LDL natives

Des études réalisées *in vivo* chez l'homme ont permis de mettre en évidence une accumulation des autologues des LDL marqués à l'iode 125, à l'indium 111 et au technétium 99m dans les plaques d'athérome au niveau des artères carotidiennes, iliaques et fémorales. L'histologie réalisée après endarterectomie indique que cette accumulation est corrélée aux plaques d'athérome contenant un grand nombre de cellules spumeuses et de macrophages. En revanche, les plaques d'athérome fibreuses ne sont pas visibles en imagerie. L'imagerie est réalisée à des temps très tardifs, 21 ou 36 heures après injection du radiotracer, en raison de la très longue demi-vie biologique des LDL radiomarquées dans le plasma (2 à 6 jours) (Lees 1983, Lees 1988).

(b) LDL oxydées

Les LDLox étant captées plus rapidement par les macrophages via les récepteurs «scavenger» que les LDL via les LDLr, les équipes de recherche se sont tournées vers l'utilisation de LDLox radiomarquées. Une étude réalisée chez l'homme au niveau de l'artère carotidienne a montré que la captation des LDLox marquées au technétium 99m est légèrement plus élevée que celle des LDL natives marquées au technétium 99m. Mais cette différence n'est pas suffisante pour améliorer la détection des lésions. Ces résultats suggèrent que la captation initiale des LDL au niveau de la plaque d'athérome n'est pas dépendante de leur état d'oxydation (Iuliano 1996).

(c) Peptides

Afin de s'affranchir des problèmes liés à une activité circulante importante du traceur, l'utilisation d'un fragment peptidique des LDL a été évaluée. Il s'agit d'une portion de

l'apolipoprotéine B marquée à l'iode (SP-4) ou au technétium (SP-199). SP-4 et SP-199 s'accumulent tous deux dans les plaques d'athérome aortiques (Hardoff 1993, Hardoff 1995). Le choix du ligand est discutable puisque l'accumulation des LDL dans la paroi artérielle n'est pas médiée par les récepteurs LDLr qui lient l'apoB. Ainsi, chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, une mutation du LDLr bloque sa liaison aux LDL circulantes mais n'empêche pas l'accumulation de ces LDL dans la paroi artérielle et la formation des plaques d'athérome (Vallabhajosula 1997).

(d) Anticorps

Les anticorps spécifiques d'épitopes de LDLox ont été évalués comme radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable. MDA-2 est un anticorps murin monoclonal dirigé contre les LDL-malondialdehyde (LDL-MDA). MDA-2 ne lie ni les LDL natives, ni les HDL, ni les VLDL. *In vivo*, MDA-2 marqué à l'iode-125 ou au technétium-99m s'accumule dans les plaques d'athérome en progression chez les lapins et les souris hypercholestérolémiques. Chez le lapin, la fixation au niveau des lésions aortiques des animaux hypercholestérolémiques est 17,4 fois plus élevée que celle observée pour les animaux contrôles (Figure 42) (Tsimikas 2002).

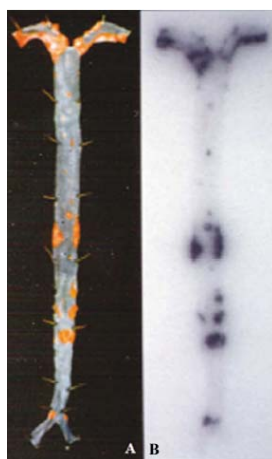


Figure 42. Images obtenues *ex vivo* de l'aorte d'une souris apoE^{-/-} (Tsimikas 2002).

La localisation des régions lipidiques par coloration au Sudan IV des plages lipidiques (coloration rouge, A) est corrélée à la fixation de MDA2 déterminée par autoradiographie (B).

Néanmoins, la cinétique sanguine de ce radiotraceur est très lente et il faut 12 heures pour que l'activité initiale soit divisée par 2. Ainsi l'obtention d'images *in vivo* chez le lapin nécessite 14 à 26 heures de délai, ainsi qu'une injection de 10 mg de LDL-MDA 2 heures avant

l'obtention des images afin d'augmenter l'élimination de la fraction circulante du radiotraceur (Figure 43). Malgré cette contrainte, un anticorps humain a été développé en vue d'une utilisation humaine (Tsimikas 1999, Tsimikas 2002).

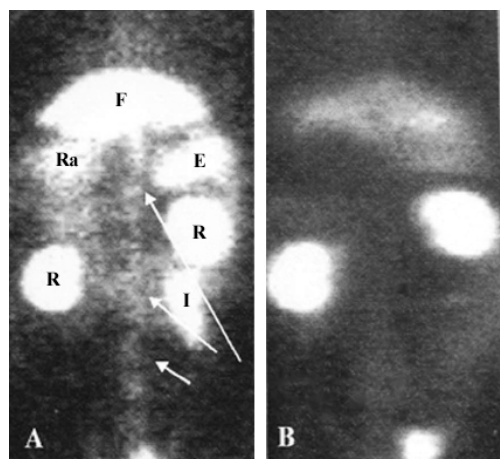


Figure 43. Images dorsales obtenues *in vivo* chez le lapin avec MDA2 (Tsimikas 2002).

16 heures après l'injection de MDA2 et 2 heures après l'injection de 10 mg de LDL-MDA, l'aorte abdominale est bien visible chez le lapin hyperlipidémique (flèches en A) comparativement au lapin contrôle (B). F : Foie, Ra : Rate, E : Estomac, R : Rein, I : Intestin.

b. Les cellules musculaires lisses proliférantes

Les cellules musculaires lisses jouent un rôle crucial dans l'athérogénèse. La prolifération et la migration de ces cellules sont impliquées dans la formation des cellules spumeuses, la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que la synthèse de fibrinogène, collagène et protéoglycanes (Narula 1995). Le choix de cette cible pour l'imagerie de la plaque à risque est cependant discutable puisque les cellules musculaires lisses de l'intima peuvent jouer un rôle stabilisateur en synthétisant la capsule fibreuse. L'apoptose de ces cellules diminue l'épaisseur de la capsule fibreuse et augmente la vulnérabilité des plaques (Chap III E) (Glass 2001, Geng 1997).

(a) Analogues de l'endothéline

L'endothéline est impliquée dans les processus d'athérosclérose et de resténose. Les récepteurs A et B de l'endothéline sont exprimés par les cellules musculaires lisses de rat après une angioplastie et leurs ARN messagers ont été détectés dans les plaques d'athérome humaines (Tepe 2001). Un radiotraceur technétié dérivé de l'endothéline a été évalué sur des

modèles expérimentaux d'athérosclérose induite chez le lapin par déendothélialisation de l'aorte ou de l'artère iliaque. Ces premières études indiquaient une accumulation de ce radiotracer dans les plaques d'athérome en corrélation avec le nombre de cellules musculaires lisses intimes (Dinkelborg 1998, Tepe 2001). Mais une étude réalisée par la même équipe sur deux modèles expérimentaux d'athérosclérose a montré qu'il n'y avait pas de lien direct entre l'expression des récepteurs à l'endothéline et l'athérosclérose. Les auteurs en concluent finalement que les récepteurs à l'endothéline ne constituent pas une cible d'intérêt pour l'imagerie des plaques d'athérome (Meding 2002).

(b) Anticorps

L'IgM Z2D3 est un anticorps murin dirigé contre les cellules humaines proliférantes. Cet anticorps a été modifié génétiquement afin d'obtenir un anticorps chimérique possédant une région constante d'IgG₁ humaine puis trypsinisé. Le fragment F(ab')₂ obtenu a été évalué comme radiotracer de la plaque d'athérome après radiomarquage à l'indium 111 ou au technétium 99m.

Le radiotracer ¹¹¹In-Z2D3 F(ab')₂ a été évalué *in vivo* sur un modèle expérimental d'athérosclérose induite chez le lapin par une déendothélialisation de l'aorte abdominale associée à un régime hyperlipidémique (Narula 1995, Narula 1996). Les lésions sont visibles en imagerie 48 heures après injection du radiotracer. L'ajout de charges négatives sur le radiotracer permet de diminuer ce délai en augmentant son élimination sanguine. La cinétique du radiotracer reste cependant lente ($t_{1/2} = 757$ min) et les lésions ne sont visibles que 24 heures après l'injection (Narula 1995). *In vivo* chez l'homme, l'accumulation de ¹¹¹In-Z2D3 F(ab')₂ dans les plaques carotidiennes est visible dès 4 heures malgré une cinétique sanguine très lente ($t_{1/2} = 920$ minutes) (Carrio 1998).

La mise au point du radiotracer ^{99m}Tc-Z2D3 F(ab')₂ permet de réduire d'avantage le délai nécessaire pour la réalisation de l'imagerie. La cinétique sanguine reste néanmoins relativement lente et les lésions ne sont visibles que 9 à 12 heures après l'injection (Figure 44). La fixation déterminée *ex vivo* en autoradiographie est 4,3 fois plus élevée au niveau des lésions qu'au niveau des zones saines (Narula 1997).

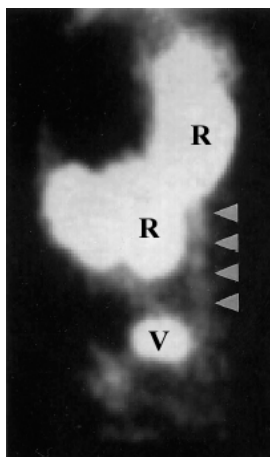


Figure 44. Image latérale obtenue *in vivo* chez le lapin avec $^{111}\text{In-Z2D3 (Fab')}_2$ (Narula 1997).

12 heures après l'injection, l'aorte abdominale est visible chez les lapins hyperlipidémiques.
R : Rein, V : Vessie.

(c) Analogues de l'adénine

Au sein de la plaque d'athérome, de nombreuses cellules expriment des récepteurs à l'adénosine. Les plaquettes possèdent le récepteur P2T, les macrophages, monocytes et cellules musculaires lisses, les récepteurs P2x et P2y. Elmaleh et al ont fait l'hypothèse que deux analogues de l'adénine radiomarqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Ap4A et AppCHClppA, pourraient s'accumuler dans les cellules musculaires lisses proliférantes de la plaque d'athérome. Les résultats obtenus sur un modèle expérimental d'athérosclérose induite chez le lapin par une déendothélialisation de l'aorte abdominale associée à un régime hyperlipidémique montrent qu'il est possible de visualiser les lésions athérosclérotiques dès la quinzième minute suivant l'injection des radiotraceurs. Néanmoins, les récepteurs purinergiques sont nombreux et la localisation des radiotraceurs devra être évaluée par micro-autoradiographie (Elmaleh 1998).

c. Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMP) constituent une famille d'endopeptidases qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire et déstabilisent la plaque. Elles peuvent être synthétisées par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes (Chap III F.2) (Faia 2002). Le CGS 27023A est un inhibiteur des MMP. Différents radiotraceurs ont été synthétisés à partir de cette molécule et le [^{123}I]-HO-CGS

27023A a été retenu en raison de sa bonne affinité *in vitro* pour les MMP-2 et MMP-9 (Kopka 2004). *In vivo* chez la souris hyperlipidémique ApoE^{-/-}, les lésions induites au niveau de l'artère carotidienne ligaturée sont visibles 2 heures après l'injection de ce radiotracer. Cette fixation est spécifique puisqu'elle est bloquée par une pré-injection de traceur non radiomarqué (Figure 45). La biodistribution indique que la fixation au niveau de l'artère ligaturée développant des plaques est 2,7 fois plus élevée qu'au niveau de l'artère saine (Schäfers 2004).

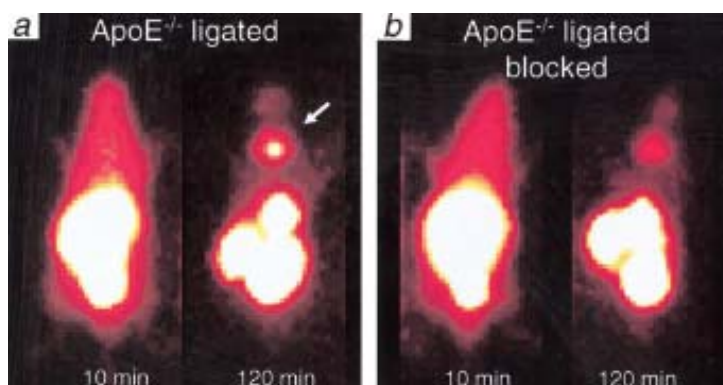


Figure 45. Imagerie réalisée chez la souris avec [¹²³I]-HO-CGS 27023A (Schäfer 2004).

a : 120 minutes après l'injection du radiotracer, les lésions athérosclérotiques sont visibles au niveau de l'artère carotidienne ligaturée des souris ApoE^{-/-} (flèche).

b : Une pré-injection de traceur non radiomarqué 2 heures avant celle du radiotracer bloque cette fixation (b).

d. Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la formation et le développement de la plaque d'athérome vulnérable. Ainsi, les souris hypercholestérolémiques deviennent fortement résistantes au développement des plaques d'athérome lorsqu'elles sont croisées avec une souche de souris déficientes en macrophages. Comme nous l'avons vu précédemment, ces cellules sont notamment responsables de la formation des cellules spumeuses, du recrutement et de l'activation des lymphocytes T, de la formation du corps nécrotique et lipidique ainsi que de la synthèse de métalloprotéinases et de la « C-Reactive Protein » (CRP). Les macrophages fragilisent la plaque d'athérome et la forte densité de ces cellules à la base des plaques correspond à la zone de rupture préférentielle des plaques d'athérome vulnérables (Chap III D) (Li 2002).

(a) Anticorps

Les macrophages, ainsi que les cellules spumeuses dérivées de ces macrophages expriment à leur surface des récepteurs au fragment constant (Fc) des immunoglobulines. Ces récepteurs permettent la reconnaissance et l'internalisation d'antigènes liés à des anticorps circulants. Une hypothèse a été émise selon laquelle des immunoglobulines radiomarquées pourraient se lier aux macrophages par leur Fc et constituer un radiotraceur des macrophages recrutés dans les plaques d'athérome vulnérables.

Une IgG polyclonale non spécifique a été évaluée après radiomarquage à l'indium-111. Une étude autoradiographique réalisée chez le lapin indique que 48 heures après l'injection du radiotraceur l'activité est 6 fois plus élevée au niveau de l'aorte abdominale déendothélialisée qu'au niveau de l'aorte dorsale saine (Fischman 1989). Chez l'homme, ce radiotraceur permet de visualiser 86% des lésions carotidiennes observées en imagerie ultrasonore, mais la fixation n'est pas corrélée avec le stade d'évolution de la plaque. Chez le lapin hyperlipidémique, la cinétique sanguine de ¹¹¹In-IgG est très lente (environ 6 heures) et les plaques d'athérome aortiques ne sont pas visibles en imagerie, même 72 heures après l'injection du radiotraceur (Demacker 1993).

(b) MCP-1

Les monocytes sont attirés au niveau des plaques d'athérome par diverses substances chémoattractrices. Parmi celles-ci le MCP-1, un peptide monomérique produit par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages, lie le récepteur CCR-2 exprimé par les monocytes et les macrophages. Le MCP-1 a été évalué après radiomarquage à l'iode ou au technétium comme radiotraceur des macrophages recrutés au sein des plaques d'athérome. Sur un modèle animal d'athérosclérose induite chez le lapin par déendothélialisation d'une artère iliaque associée à un régime hypercholestérolémique, ¹²⁵I-MCP-1 s'accumule au niveau des lésions. Le rapport de fixation entre les zones athérosclérotiques et les zones saines à 3 heures, déterminé après autoradiographie, est de 6. Cette fixation est corrélée au nombre de macrophages présents au sein des lésions (R = 0,85) (Figure 46).

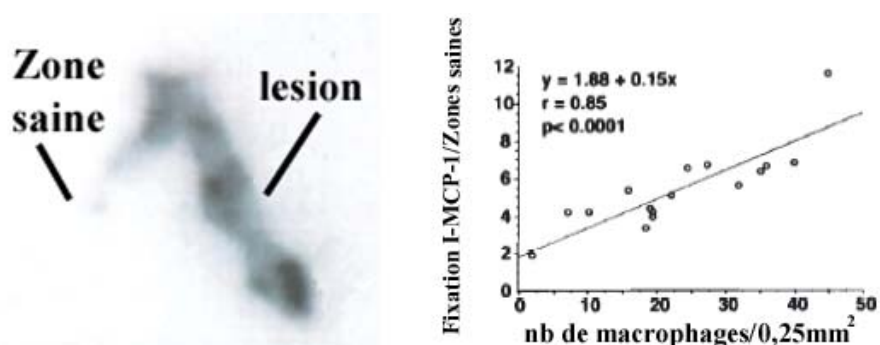


Figure 46. Résultats obtenus avec le ^{125}I -MCP-1 (Ohtsuki 2001).

A gauche, l'autoradiographie des artères iliaques du lapin. La fixation de MCP-1 sur l'artère iliaque déendothélialisée est 6 fois plus élevée que sur l'artère iliaque saine. Cette fixation est corrélée au nombre de macrophages (graphique de droite).

De plus, la cinétique sanguine de ce traceur est rapide ($t_{1/2} = 10$ minutes) (Ohtsuki 2001). Un radiomarquage au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a été réalisé et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 a été évalué chez le lapin. Les lésions athérosclérotiques sont visibles chez tous les animaux 3 heures après l'injection du radiotracer (Petrov 2003).

(c) [^{18}F]-Fluorodéoxyglucose

Le [^{18}F]-Fluorodéoxyglucose (FDG) est un analogue du glucose marqué au fluor 18, un émetteur de positon détectable en imagerie TEP (tomographie par émission de positon). Il s'accumule dans les cellules qui consomment du glucose. Or les macrophages recrutés au sein de la plaque d'athérome présentent un métabolisme exacerbé qui nécessite une forte consommation de glucose. Ce radiotracer couramment utilisé en cancérologie a donc été évalué pour l'imagerie des plaques d'athérome riches en macrophages. Chez l'homme, il permet la visualisation des plaques d'athérome carotidiennes infiltrées par les macrophages (Rudd 2002). Dans une étude réalisée chez le lapin hyperlipidémique, le FDG s'accumule au niveau des lésions aortiques et permet leur visualisation en imagerie TEP. Cette fixation, quantifiée après une biodistribution réalisée 4 heures après l'injection, est 3 fois plus élevée que celle observée chez les animaux du groupe contrôle. De plus, elle est corrélée avec le nombre de macrophages recrutés dans la lésion ($R = 0,81$). Néanmoins, le FDG est également fortement capté par les cellules cardiaques et le bruit de fond élevé est problématique pour la détection des plaques situées au niveau des artères coronaires. Le développement d'une sonde intravasculaire sensible aux positons est donc envisagé (Chap VIII-B-1.1-h) (Ogawa 2004).

e. L'apoptose

L'apoptose joue un rôle clef dans la déstabilisation des plaques d'athérome et constitue donc une cible potentielle pour son diagnostic (Chap III F.1) (Strauss 2000⁽²⁾). En effet, les plaques d'athérome vulnérables sont caractérisées par une large plage lipidique et nécrotique recouverte par une capsule fibreuse fine. Or, l'apoptose des cellules spumeuses contribue largement à la formation de la plage lipidique et nécrotique, et l'apoptose des cellules musculaires lisses entraîne l'amincissement de la capsule fibreuse (Glass 2001, Geng 1997).

L'expression des phosphatidylsérines (PS) dans la membrane plasmique des cellules apoptotiques n'est plus asymétrique. Les PS se retrouvent donc exposées sur la face externe des membranes de ces cellules qui sont alors reconnues et phagocytées par les macrophages. L'Annexine V est un ligand des PS. Cette molécule a été radiomarquée au ^{99m}Tc et évaluée comme radiotraceur de l'apoptose dans les plaques d'athérome.

Le radiotraceur ^{99m}Tc-Annexine V a été évalué sur un modèle d'athérosclérose induite chez le lapin par déendothélialisation de l'aorte abdominale associée à un régime hyperlipidémique. La cinétique sanguine de ce traceur est rapide et l'autoradiographie indique que la fixation du radiotraceur au niveau des lésions est 15 ± 7 fois plus élevée que celle observée au même niveau chez les animaux contrôles. Les lésions sont visibles en imagerie 2 heures après l'injection de ^{99m}Tc-Annexine V (Figure 47).

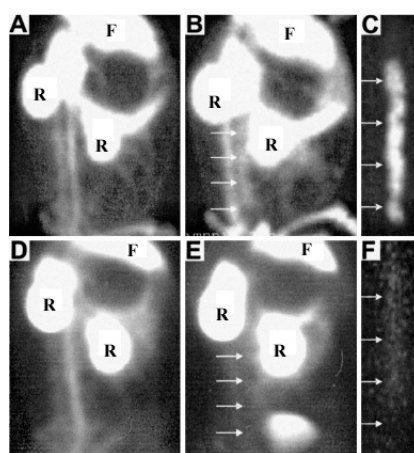


Figure 47. Images scintigraphiques obtenues *in vivo* chez le lapin avec ^{99m}Tc-Annexine V (Kolodgie 2003).

Images en face latérale oblique de l'aorte abdominale déendothélialisée (A, B et C) ou saine (D, E et F) de lapins. *In vivo*, l'aorte est nettement visible lors de l'injection du radiotraceur (A et D). L'aorte est également visible à 2 heures chez les lapins déendothélialisés (B) mais pas chez les lapins du groupe contrôle (E). L'imagerie *ex vivo* des aortes confirme ces résultats (C et F). F : foie, R : rein

L'histologie indique que cette fixation est corrélée au nombre de macrophages recrutés mais pas à celui des cellules musculaires lisses (Kolodgie 2003). Ce radiotracer a également permis de visualiser *in vivo* les plaques d'athérome induites au niveau des artères coronaires par déendothélialisation sur un modèle de porc (Johnson 2003). Chez l'homme, une étude préliminaire réalisée sur 4 patients a montré que l'apoptose dans les plaques d'athérome carotidiennes pouvait être visualisée six heures après l'injection de ^{99m}Tc -Annexine V (Kietselaer 2004).

f. Le thrombus

La rupture de la plaque d'athérome conduit à la formation d'un thrombus (Chap III F.4). De nombreux radiotraceurs de ce thrombus ont été évalués. Ils ont pour cibles les plaquettes, la fibrine et les molécules fibrinolytiques. Ces radiotraceurs de l'athérombose sont particulièrement intéressants pour diagnostiquer les événements coronariens aigus, ainsi que les thromboses veineuses (Vallabhajosula 1997, Ord 1992, Mitchel 2000). En revanche, il n'y a pas de thrombus au niveau des plaques vulnérables non compliquées (Stade IV et Va) (Stary 1995).

g. Conclusions

De nombreux radiotraceurs ont été ou sont actuellement évalués pour le diagnostic de la plaque d'athérome coronaire vulnérable. La principale limitation provient d'un rapport signal sur bruit trop faible pour permettre l'obtention d'images scintigraphiques en détection externe. Il existe deux principales causes à ceci :

- La cinétique sanguine lente de certains radiotraceurs (Anticorps, LDL),
- La fixation non spécifique. En effet, la taille des plaques d'athérome est de l'ordre de 1 mm^3 , et une fixation non spécifique dans le tissu myocardique environnant, même faible, peut rendre l'imagerie de la plaque difficile malgré une bonne spécificité du radiotracer pour sa cible.

Ainsi, dans la plupart des études réalisées *in vivo* chez l'homme ou l'animal, l'imagerie est réalisée au niveau des plaques d'athérome localisées sur les artères de gros diamètres (aorte abdominale) ou superficielles (carotides). Seuls Johnson et al. décrivent, dans le résumé d'une étude en cours, l'obtention d'images de plaques localisées au niveau des artères coronaires chez le porc avec ^{99m}Tc -Annexine V (Johnson 2003). D'autres radiotraceurs en cours

d'évaluation semblent prometteurs (MCP-1, CGS 27023A), néanmoins la mise au point d'un radiotracteur possédant une forte spécificité pour la plaque d'athérome vulnérable associée à une faible fixation non spécifique et à une cinétique sanguine rapide constitue toujours à l'heure actuelle un enjeu majeur en médecine nucléaire.

3. Conclusion

De très nombreuses modalités d'imagerie, invasives ou non invasives, sont actuellement à l'étude pour le diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable. L'imagerie invasive ne peut pas être envisagée sur une large population. Dans un premier temps, les patients identifiés comme étant à risque à l'issue des évaluations biologiques et cliniques seront donc proposés pour un examen d'imagerie non-invasif. Si toutefois cet examen ne permet pas d'établir correctement le diagnostic, l'imagerie invasive pourra alors être proposée.

La résolution constitue la principale limitation de l'imagerie morphologique. En l'absence d'informations d'ordre métabolique ou fonctionnel sur la plaque, il est en effet indispensable de pouvoir caractériser très finement sa structure afin de pouvoir discriminer les plaques vulnérables des plaques stables. Parmi les différentes modalités envisagées, seule l'OCT possède la résolution nécessaire pour apprécier l'étendue de la plage lipidique et nécrotique ainsi que l'épaisseur de la capsule fibreuse ($<100 \mu\text{m}$), mais cette technique n'est pas encore utilisable *in vivo* en présence du flux sanguin.

Le couplage d'une information morphologique avec une information métabolique ou fonctionnelle pourrait permettre de pallier au manque de résolution. Ainsi le couplage de l'IVUS avec l'élastographie ou la thermographie, ainsi que l'utilisation de traceurs spécifiques de la plaque vulnérable en IVUS et en IRM constituent des axes de recherche prometteurs.

La médecine nucléaire, grâce à sa haute sensibilité et son approche métabolique, semble également tout à fait adaptée au diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable. La mise au point d'un radiotracteur possédant un rapport signal sur bruit suffisamment élevé *in vivo* constitue un enjeu majeur qui suscite de nombreuses études à l'heure actuelle.

IX. Conclusion générale

Les pathologies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde (OMS 2003). Depuis une décennie, notre compréhension de la physiopathologie des événements coronariens, depuis les aspects histomorphologiques jusqu'aux mécanismes moléculaires conduisant à la rupture des plaques d'athérome, a fortement évolué (Ross 1999, Glass 2001). L'avancée de nos connaissances a notamment permis la mise au point de traitements efficaces dans la prise en charge de l'athérosclérose (Libby 2003). De plus, le concept de plaque d'athérome vulnérable a émergé (Naghavi 2003). Ces plaques, responsables de la majorité des événements coronariens aigus, sont caractérisées par des phénomènes inflammatoires chroniques ainsi que par une large plage lipidique et nécrotique (>40% du volume) recouverte par une fine capsule fibreuse (<100 µm).

Des thérapeutiques très efficaces existent d'ors et déjà pour traiter les plaques d'athérome vulnérables. Il s'agit principalement des statines, des anti-thrombotiques et des hypotenseurs. De plus, de nouveaux pharmaceutiques sont à l'étude, incluant les fibrates et les thiazolidinediones. Aujourd'hui, le manque se situe donc au niveau du diagnostic. Il n'existe en effet aucun outil diagnostique de la plaque d'athérome vulnérable envisageable en pratique clinique. Or cette pathologie touche un grand nombre d'individus, et il devient donc essentiel de pouvoir dépister efficacement, au sein d'une large population, les individus à haut risque. La stratégie proposée consiste, à partir de l'ensemble des individus d'une population, de détecter, étape par étape, les individus à risque, les individus à haut risque et enfin les individus à très haut risque. Cette stratégie permet de réduire progressivement le nombre de patients en partant de tests simples et peu coûteux et en allant vers des examens cliniques plus longs et plus coûteux.

- Déterminer le risque clinique des patients.

Cette première évaluation peut être réalisée sur la base de critères simples, tel que l'âge, le sexe, le poids et les antécédents familiaux.

- Déterminer le risque biologique des patients.

Le score de risque est déterminé à l'aide d'une équation mathématique telle que celle de Framingham, qui fait intervenir les facteurs de risque précédemment cités pour l'évaluation du risque clinique ainsi que les dosages sanguins de différents facteurs de risque (LDL, HDL, CRP...).

- Déterminer la présence des plaques d'athérome vulnérables à l'aide de l'imagerie non-invasive.
- Si nécessaire, déterminer la présence des plaques d'athérome vulnérables à l'aide de l'imagerie invasive.

N'étant généralement que peu ou pas sténosantes, l'angiographie ne permet pas de diagnostiquer les plaques d'athérome vulnérables (De Franco 2001). De nombreuses autres modalités d'imagerie sont donc en cours d'évaluation. Parmi celles-ci, on distingue les méthodes invasives des méthodes non invasives, ainsi que les approches morphologiques, métaboliques ou fonctionnelles. Ces techniques ne sont donc pas redondantes, et la combinaison de différentes modalités complémentaires est fréquemment envisagée. Ainsi, parmi les différentes modalités invasives, une technique morphologique telle que l'IVUS, l'IRM ou l'OCT pourrait être couplée avec une technique apportant une information d'ordre métabolique ou fonctionnel telle que la spectrométrie, l'élastographie ou la thermographie. Cependant, il n'est pas envisageable d'utiliser ces modalités d'imagerie invasive sur une large population. Il est donc nécessaire d'établir au préalable un diagnostic à l'aide d'une modalité d'imagerie non-invasive. Parmi les techniques non-invasives, la médecine nucléaire constitue une technique d'imagerie moléculaire très sensible qui semble tout à fait adaptée au diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable (MacNeill 2003). De nombreux radiotraceurs sont en cours de développement. Ils sont dirigés contre différentes cibles spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable (lipides oxydés, inflammation, apoptose, MMP) (Vallabhajosula 1997). Malgré ces développements, ni la médecine nucléaire, ni aucune autre modalité d'imagerie, n'est actuellement utilisée en pratique clinique pour le diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable.

La présente étude a pour but l'évaluation de nouveaux radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable utilisables en médecine nucléaire. La cible choisie est la Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), impliquée dans les phénomènes inflammatoires au sein de la plaque d'athérome vulnérable. Les ligands évalués sont des motifs peptidiques issus d'une molécule du CMH-1 et décrits pour lier VCAM-1 *in vitro* et *in vivo* (Chap III.C.1.2) (Ling 2000).

Partie II : Travail expérimental

**Evaluation de nouveaux radiotraceurs
de la plaque d'athérome vulnérable.**

I. Introduction

Les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de décès dans les pays industrialisés et sont responsables d'un tiers des décès dans le monde (OMS - Rapport 2003). La majorité de ces décès sont causés par la rupture de la plaque d'athérome vulnérable et la formation d'un thrombus (Naghavi 2003). La plaque d'athérome vulnérable est une pathologie inflammatoire chronique de la paroi artérielle caractérisée par la formation d'une large plage lipidique et nécrotique (>40% du volume de la plaque) recouverte par une fine capsule fibreuse (<100 µm). Durant ces 10 dernières années, nos connaissances de la physiopathologie de la plaque d'athérome ont considérablement évolué (Ross 1999, Glass 2001, Libby 1995, Fuster 1995). Malgré cela, il n'existe pas à l'heure actuelle d'outil diagnostique disponible en pratique clinique pour détecter la présence des plaques d'athérome vulnérables (Nemirovsky 2003). Il n'existe que des scores clinico-biologiques, efficaces pour définir la population à risque mais inadaptés pour établir le diagnostic d'un individu donné. Cependant, des traitements efficaces existent. Il est donc essentiel de mettre au point un outil de détection non-invasif de la plaque d'athérome vulnérable, utilisable sur une large population. Parmi les différentes modalités d'imagerie envisagées, la médecine nucléaire est une technique très sensible d'imagerie moléculaire qui semble tout à fait adaptée pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables. Son principe repose sur l'injection et la détection d'un radiotraceur spécifique d'une cible d'intérêt. Il peut s'agir d'une molécule ou d'une cellule radiomarquée à l'aide d'un isotope émetteur de photons gamma détectables en imagerie planaire ou tomographique par détection de simples photons (SPECT), ou émetteur de positons détectables en imagerie tomographique par émission de positons (TEP).

A. Choix de la cible

Les phénomènes inflammatoires, qui induisent les plaques d'athérome à se développer vers un phénotype vulnérable, sont caractérisés par le recrutement dans la paroi artérielle des leucocytes mononucléés circulants (monocytes et lymphocytes) (Ross 1999). Différentes molécules d'adhésion sont impliquées dans les processus de « rolling » des leucocytes en surface de l'endothélium, dans l'adhésion de ces leucocytes et dans leur migration à travers l'endothélium. Les sélectines E et P sont impliquées dans le « rolling », la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire 1

(ICAM-1) dans l'adhésion et la diapédèse (Chia 1998, Huo 2001). Des études fondamentales ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de VCAM-1 lors de l'initiation et du développement des plaques d'athérome vulnérables. Ainsi, la présence d'une VCAM-1 tronquée chez des souris transgéniques hyperlipidémiques inhibe la formation de la plaque d'athérome (Ley 2001, Cybulsky 2001). VCAM-1 est une immunoglobuline de 110 kDa de la superfamille des immunoglobulines, exprimée en surface de l'endothélium vasculaire activé. Elle se lie au « Very Late Activation antigen-4 » (VLA-4) exprimé à la surface des leucocytes mononucléés (Osborn 1989). VCAM-1 n'est pas présente sur l'endothélium en condition normale. En revanche, VCAM-1 est exprimée au niveau de l'endothélium activé par des facteurs pro-inflammatoires (LDLox, virus) ainsi qu'au niveau des sites de dysfonction endothéliale induite par des forces de cisaillement faibles et oscillantes (Cybulsky 1991; Malek 1999). De plus, VCAM-1 reste exprimée durant toute la phase inflammatoire, y compris aux stades tardifs de formation de la plaque d'athérome vulnérable, et cette expression, contrairement à celle de ICAM-1, reste localisée au niveau des plaques (Iiyama 1999).

L'inflammation est donc caractérisée par le recrutement de monocytes et lymphocytes T au sein des plaques d'athérome et VCAM-1 joue un rôle majeur dans ce phénomène. Cette infiltration leucocytaire fait partie des critères majeurs de définition de la plaque d'athérome vulnérable (Naghavi 2003). VCAM-1 constitue donc une cible extrêmement pertinente pour l'imagerie non-invasive de la plaque d'athérome vulnérable.

B. Choix du ligand

Ling et al. (2000), ont observé que le résidu peptidique 75-84 de la molécule du CMH-1 B2702 présentait un effet immunomodulateur puissant à une liaison spécifique à VCAM-1. Cet effet immunomodulateur, observé chez l'animal et chez l'homme (Nossner 1996), s'expliquerait donc par une compétition entre le peptide et VLA-4. Les auteurs ont montré que le motif dimérique B2702(R) (séquence : 84-75/75-84), formé par la répétition et l'inversion de B2702 (séquence : 75-84), est le meilleur inhibiteur de la liaison VCAM-1/VLA-4. Sur un modèle *in vivo* d'inflammation pulmonaire induite chez la souris par de l'ovalbumine, ce motif peptidique bloque le recrutement des leucocytes (Ling 2000).

Considérant la surexpression de VCAM-1 dans les plaques d'athérome vulnérables, les séquences monomériques B2702 et dimériques B2702(R) liant spécifiquement VCAM-1 ont été radiomarquées avec des isotopes émetteurs de photons gamma (iode 125, iode 123 et technétium 99m) et les radiotraceurs obtenus ont été évalués pour la détection non invasive en médecine nucléaire des plaques d'athérome vulnérables.

II. Chimie et radiochimie

A. Synthèse des peptides

La synthèse des peptides est réalisée par l'équipe du LEDSS V (Ingénierie moléculaire- UMR 5616 CNRS, Université de Grenoble) qui collabore avec le laboratoire sur ce projet.

B2702 [RENLRIALRY], B2702(R) [YRLAIRLNERRENLRIALRY] ainsi que B2702-His [RENLRIALRYGH], une version modifiée de B2702 pour le marquage au technétium, ont été synthétisés en phase solide. L'assemblage des peptides protégés est réalisé soit manuellement avec une technique utilisant la stratégie Fmoc/tBu dans un flacon de réaction en verre, soit automatiquement à l'aide d'un synthétiseur (348 Ω synthesizer, Advance ChemTech). Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant 1,5 à 2 équivalents d'acides aminés protégés avec le N- α -Fmoc activé *in situ* avec 1,5 à 2 équivalents de PyBOP et 3 à 4 équivalents de diisopropylethylamine (DIEA) dans du Diméthylformamide (DMF) (10 ml/g résine) pendant 30 minutes. Lorsque la synthèse est réalisée manuellement, elle est ensuite contrôlée par un test de Kaiser ou par un test TNBS. Les groupes protecteurs N- α -Fmoc sont supprimés par un traitement au DMF/pipéridine (4:1) (10 ml/g de résine) pendant 10 minutes. Le processus est répété 3 fois et la suppression est contrôlée par l'absorbance aux UV de la pipéridine à 299 nm. Les peptides linéaires synthétisés sont récupérés par clivage acide (1% TFA dans le CH₂Cl₂). Les résines sont ainsi traitées de manière répétée pendant 3 minutes jusqu'à apparition d'une coloration violette. Le liquide de lavage récupéré est concentré à basse pression et les peptides, de couleur blanche, sont récupérés sous forme solide par précipitation à l'éther puis analysés par Chromatographie Liquide Haute performance en Phase Inverse (CLHP-PI). Si nécessaire, une purification sur colonne est réalisée.

La molécule RAFT-B2702 est formée d'un decapeptide cyclique (Boturny 2004) comportant une histidine (H) sur laquelle le marquage au technétium est réalisé. Sur la face opposée au

site de radiomarquage, 4 domaines de fixation permettent de greffer 4 peptides B2702 linéaires (RENLRALRY) (Figure 48).

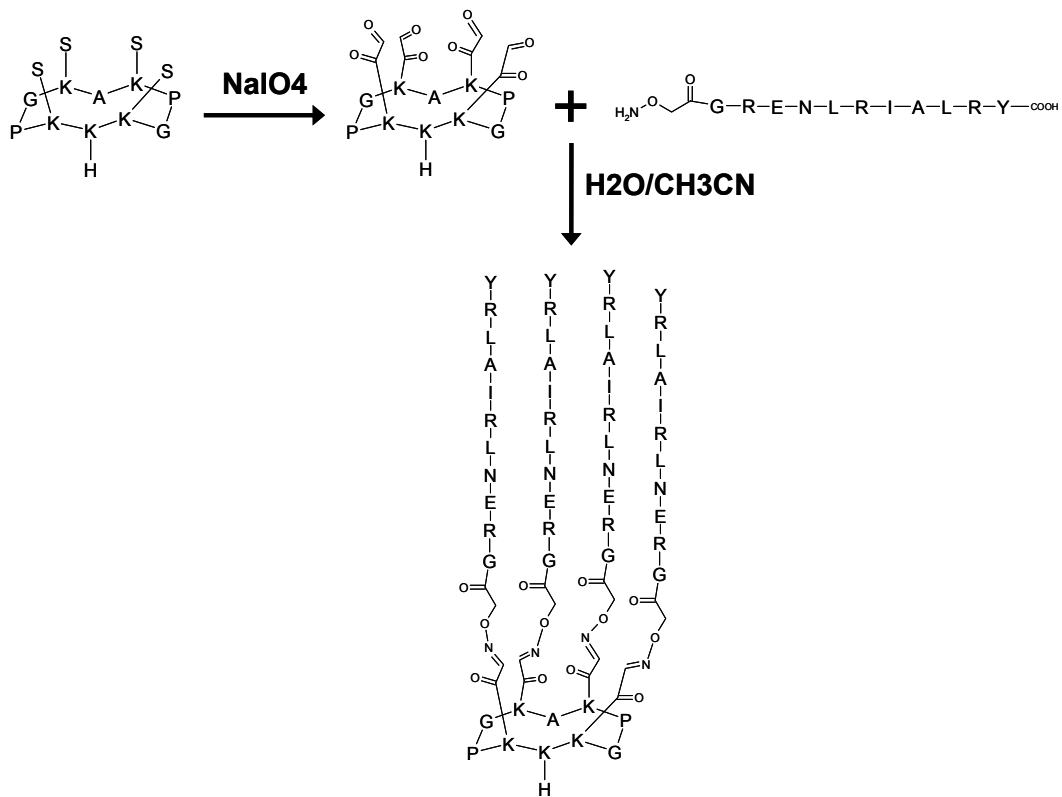


Figure 48. Synthèse du RAFT-B2702.

B. Radiomarquage

1. Radioiodation

L'iode radioactif est greffé sur la tyrosine terminale (Aa 84) avec la méthode de la chloramine T. Pour le premier protocole de 30 minutes, les peptides B2702(R) et B2702 sont radioiodés à l'iode 125 (Amersham radiochemical center). Pour le second protocole de 180 minutes, le peptide B2702 est également radioiodé à l'iode 123 (Schering SA).

74 MBq d'iode 125 ou 200 MBq d'iode 123 sont respectivement ajoutés à 20 ou 40 nmoles de peptides et 20 ou 80 µl de chloramine T préparée extemporanément (1mg/mL). La réaction est stoppée après 15 minutes par l'ajout de 20µl (pour l'iode 125) ou 80µl (pour l'iode 123) de sodium métabisulfide (4mg/ml). Une analyse par chromatographie couche mince (CCM) (RP-18R254; Merck) avec un solvant acétonitrile/eau (60/40) est réalisée afin de déterminer la pureté radiochimique. La pureté radiochimique est supérieure à 95% à l'issue de la

radioiodation à l'iode 125, et elle est supérieure à 80 % à l'issue de la radioiodation à l'iode 123.

2. Radiomarquage au Technétium 99m

2.1 Tc-B2702

Deux acides aminés [HG] ajoutés à la séquence 75-84 permettent le radiomarquage au technétium 99m sur l'histidine avec un système de ligand tridentate [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$. Le précurseur [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$ est synthétisé à l'aide d'un kit pharmaceutique tricarbonyle (Isolink[®], Mallinckrodt). Ce kit est reconstitué avec 2 GBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Schering SA), puis incubé à 100°C pendant 20 minutes. Après ajustement du pH à 8.0 par l'HCl 2N, 800 MBq de cette solution sont ajoutés à 38 nmoles de B2702 puis incubés 20 minutes à 80°C. La pureté radiochimique est déterminée par CCM (RP-18R254; Merck) avec un solvant acétonitrile/eau (60/40) ou NaCl 0,9%. La pureté radiochimique est supérieure à 90%.

2.2 Tc-RAFT-B2702

Le porteur RAFT-(B2702)₄ est marqué au ^{99m}Tc de la manière suivante :

Le précurseur [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$ est synthétisé à l'aide d'un kit pharmaceutique tricarbonyle (Isolink[®], Mallinckrodt). Ce kit est reconstitué avec 2 GBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Schering SA), puis incubé à 100°C pendant 20 minutes. Après ajustement du pH à 8 par l'HCl 2N, 800 MBq de cette solution sont ajoutés à 15 nmoles de RAFT-B2702₄ puis incubés 20 minutes à 80°C. La pureté radiochimique est déterminée par CCM (RP-18R254; Merck) avec un solvant acétonitrile/eau (60/40) ou NaCl 0,9%. La pureté radiochimique est supérieure à 90%.

C. Marquage fluorescent

Pour la réalisation des études *in vitro* en polarisation de fluorescence, une modification est apportée à l'extrémité N-terminale du peptide B2702 afin de le coupler à la fluorescéine pour obtenir le peptide fluorescent F-B2702 (Figure 49).

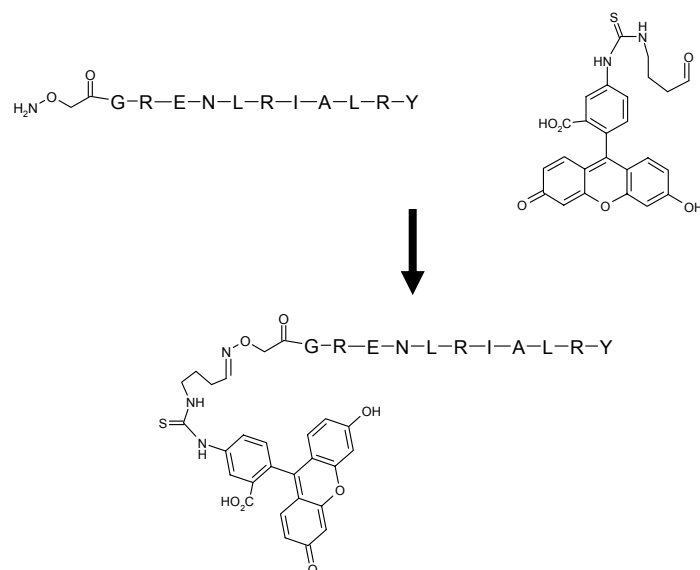


Figure 49. Synthèse de F-B2702.

D. Stabilité des traceurs

A la fin des protocoles expérimentaux, un prélèvement sanguin est réalisé et centrifugé sur un filtre Nanosep[®] 10K Omega (Pall life Science, New York, NY) afin d'évaluer la stabilité des radiotraceurs dans l'organisme par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Le solvant d'éluion de la CLHP est un gradient acétonitrile-TFA 0,1%(B)/H₂O-TFA 0,1%(A) (gradient : 0-5 mn : 5% B, 5-20mn : 5 à 80% B, 20-25 mn : 80% B).

III. Affinité des ligands pour VCAM-1

A. Principe

L'affinité des ligands pour VCAM-1 a été évaluée *in vitro* par la technique de polarisation de fluorescence. Le principe de cette technique repose sur la sensibilité des propriétés de fluorescence d'une molécule aux changements d'environnement. Une molécule fluorescente de faible poids moléculaire, placée en solution, tourne librement et rapidement sur elle-même. Lorsqu'elle est excitée par une lumière polarisée, elle réémet lors de sa désexcitation, à une énergie inférieure à l'énergie d'excitation, une lumière dépolarisée dans toutes les directions de l'espace. On dit que la molécule est « isotrope ». La valeur de polarisation (P) de la

lumière réémise, calculée à partir des intensités lumineuses recueillies parallèlement (I_{par}) et perpendiculairement (I_{per}) au faisceau d'excitation, est faible.

$$P = (I_{par} - I_{per}) / (I_{par} + I_{per})$$

Lorsque cette molécule fluorescente se lie avec un ligand de poids moléculaire élevé, la rotation du complexe formé est ralentie. Le complexe est alors « anisotrope » ; soumis à un faisceau lumineux d'excitation, il réémet une lumière polarisée dans des directions privilégiées de l'espace et la valeur de P augmente. Cette valeur s'élève proportionnellement au nombre de complexes formés jusqu'à une valeur de plateau correspondant à la complexation de toutes les molécules fluorescentes avec leur ligand (Figure 50) (Checovich 1995, Seethala 2000).

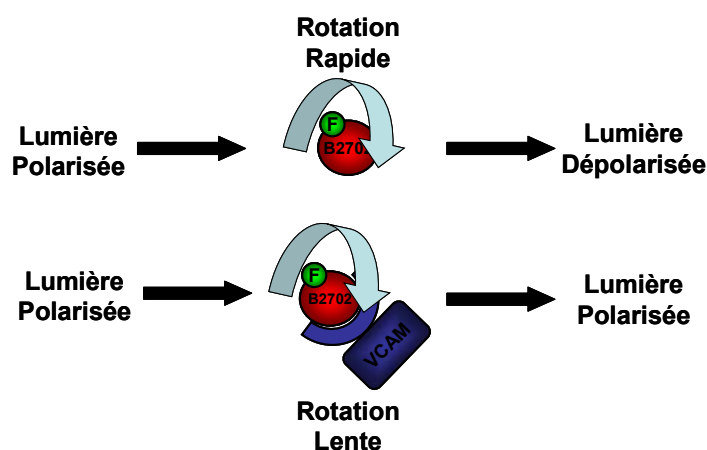


Figure 50. Principe de la polarisation de fluorescence.

Un ligand de faible poids moléculaire (B2702 ; PM = 1,5 kDa) marqué par un fluorochrome (Fluorescéine) est placé en solution. Soumis à une lumière d'excitation polarisée il réémet une lumière dépolarisée. La liaison de ce ligand à un récepteur de poids moléculaire élevé (VCAM-1, PM = 74 kDa) diminue sa vitesse de rotation et la lumière réémise devient polarisée.

B. Matériel et méthodes

Cette technique a été appliquée à l'étude de l'interaction B2702/VCAM-1. Une molécule de B2702 fluorescente (F-B2702) a été synthétisée par couplage de la fluorescéine à B2702. De faibles volumes (0,5 μ l) d'une solution mère concentrée de VCAM-1 (13,5 μ M) sont progressivement ajoutés à une solution de F-B2702, et la valeur de polarisation est mesurée

grâce à un spectromètre de fluorescence (Perkin Elmer LS50). Les mesures contrôles sont réalisées par l'ajout de tampon seul, afin d'évaluer l'effet de la dilution sur la valeur de P, ou par l'ajout de Sérum Albumine Bovine (BSA), molécule de poids moléculaire proche de celui de VCAM-1.

La faible quantité de VCAM-1 à notre disposition nous a conduit à minimiser les concentrations et volumes réactionnels. Pour cela, la linéarité de mesure du spectromètre de fluorescence a été évaluée pour différentes concentrations en F-B2702. Les résultats indiquent que la mesure n'est plus linéaire en deçà de 12,5 nM. Cette concentration a donc été choisie pour les études ultérieures. D'autre part, l'emploi de micro-cuves permet de réduire le volume réactionnel initial à 100 μ l.

Le choix du tampon pouvant influencer l'affinité de la liaison F-B2702/VCAM-1, deux tampons couramment utilisés pour les études d'interactions protéiques sont utilisés, le TBS-Tween 20 (0,1%) et l'HEPES-KCl 50 mM.

C. Résultats

L'absence de fluorescence naturelle des tampons et des solutions de VCAM-1 et SAB a été vérifiée. Les courbes obtenues dans le TBS-T (0,1%) sont présentées ici à titre d'exemple (Figures 51 et 52). Les allures des courbes obtenues dans l'HEPES et le TBS-T (0,1%) sont identiques. Elles permettent de déterminer les concentrations en VCAM-1 et SAB nécessaires pour former 50% des complexes F-B2702/VCAM-1 et F-B2702/SAB. Dans le TBS-T (0,1%), les concentrations sont de 15 μ M pour VCAM et 1392 μ M pour la SAB. Dans le tampon HEPES, ces concentrations sont de 14 μ M pour VCAM et 822 μ M pour la SAB.

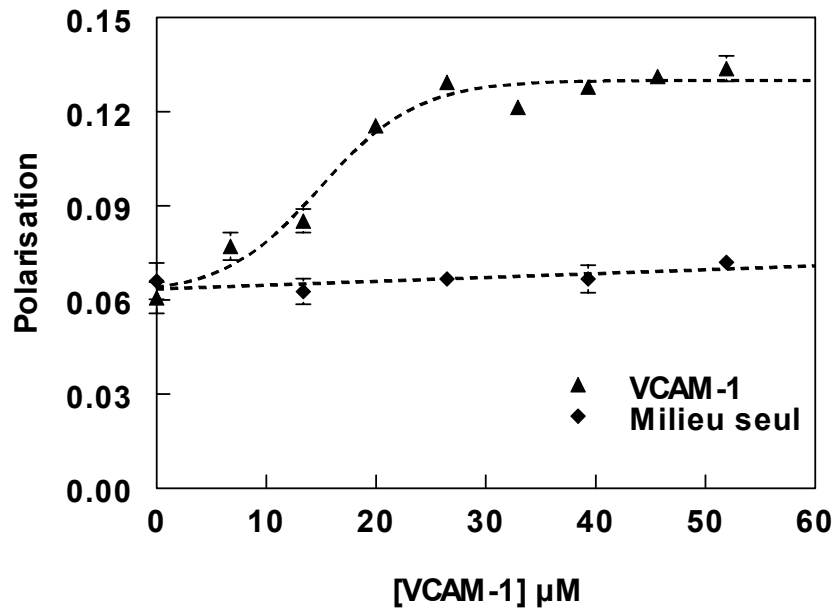


Figure 51. Courbe de saturation F-B2702/VCAM-1 obtenue dans le TBS-T 0,1%.

La concentration en VCAM-1 nécessaire pour lier la moitié des molécules de F-B2702 (12,5nM) est de 15 μM .

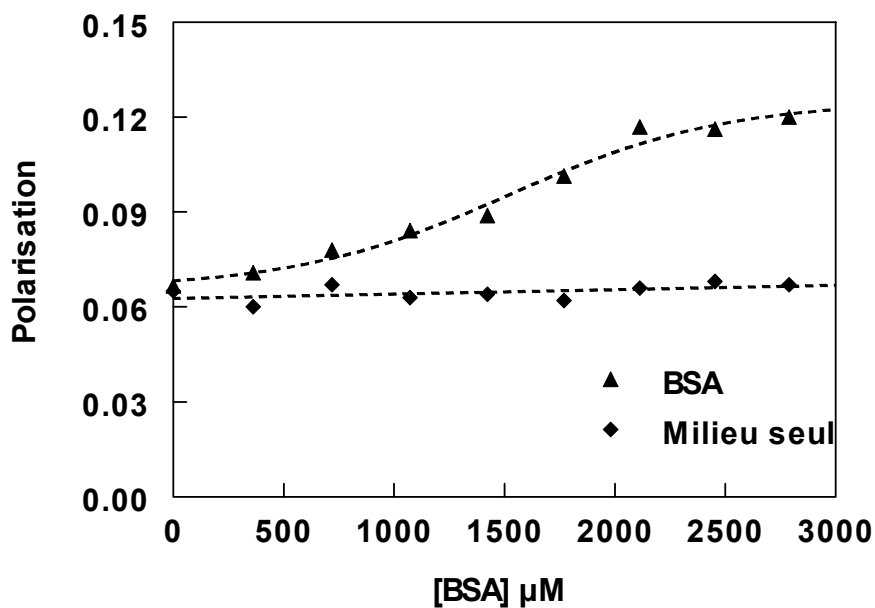


Figure 52. Courbe de saturation F-B2702/BSA obtenue dans le TBS-T 0,1%.

La concentration en BSA nécessaire pour lier la moitié des molécules de F-B2702 (12,5 nM) est de 1392 μM .

D. Discussion

Les concentrations élevées des solutions mères de VCAM-1 et de SAB permettent de réaliser les études de saturation en n'utilisant que 4 µl de ces solutions. Le facteur de dilution de la solution de F-B2702 est donc négligeable (1,04) et ne modifie pas la valeur P de polarisation ainsi que l'indique la courbe témoin réalisée par ajout de tampon seul.

Lorsque VCAM-1 est ajoutée dans la cuve contenant F-B2702, la formation de complexes VCAM-1/F-B2702 se traduit par une élévation de P jusqu'à une valeur seuil correspondant à la formation de tous les complexes. La concentration en VCAM-1 nécessaire pour lier la moitié des molécules de F-B2702 est identique dans les deux tampons testés et vaut 14 à 15 µM. Cette concentration est 60 à 93 fois inférieure à celle déterminée avec la SAB, une protéine de poids moléculaire proche de celui de VCAM-1 capable de lier de manière non spécifique un très grand nombre de petites protéines plasmatiques au niveau de poches chargées (Peters 1996). La liaison du motif peptidique B2702 à VCAM-1 décrite par Ling et al. est donc confirmée par ces études en polarisation de fluorescence (Ling 2000).

Ces études ne permettent pas de déterminer la constante de dissociation K_D de la liaison VCAM-1/F-B2702 formée. Néanmoins, les affinités relatives des différents radioligands de VCAM-1 évaluées dans cette étude pourront être déterminées grâce à cette technique selon le principe suivant :

- Un large excès de VCAM-1 est ajouté à la solution initiale de F-B2702 afin de saturer la formation des complexes VCAM-1/F-B2702. La valeur P de polarisation se trouve donc maximale.
- L'ajout dans la cuve réactionnelle de quantités croissantes d'un second ligand de VCAM-1 (I-B2702(R), I-B2702, Tc-B2702 ou Tc-RAFT-B2702) entraîne un déplacement de VCAM-1 vers ce compétiteur. Une fraction des molécules de F-B2702 est alors libérée et la valeur de P s'abaisse progressivement.

Les résultats préliminaires obtenus avec I-B2702 (R) et I-B2702 n'ont pas permis de conclure. En effet, la présence de deux compétiteurs et d'un ligand dans la cuve a entraîné une augmentation de la viscosité du milieu qui a ralenti la vitesse de rotation des molécules de F-B2702 libres ou complexées à VCAM-1, induisant par la même une importante élévation de la valeur P. Les concentrations et volumes réactionnels devront donc être réévalués afin de

pouvoir déterminer les affinités relatives des traceurs par des études de compétition en polarisation de fluorescence.

En conclusion, les premiers résultats obtenus avec la technique de polarisation de fluorescence confirment la liaison de VCAM-1 avec le motif peptidique B2702 et justifient l'évaluation *in vivo* des radiotraceurs dérivés de ce peptide dans un modèle expérimental d'athérosclérose.

IV. Etudes *in vivo* chez le lapin WHHL

A. Matériel et méthodes

1. Choix du modèle expérimental

Le modèle animal d'athérosclérose choisi est le lapin WHHL (Watanabe Heritable Hyperlipidemic). Il est caractérisé par une hyperlipidémie héréditaire. Cette souche de lapin a été décrite en 1976 par Kondo et Watanabe. Selon eux, l'hyperlipidémie héréditaire est transmise par un gène autosomique récessif. Cette hyperlipidémie se double d'une hypertriglycéridémie, et les animaux développent spontanément des plaques d'athérome (Kondo 1976). *In vitro*, les fibroblastes de WHHL ne lient pas les LDL humaines avec une haute affinité comme les fibroblastes des lapins contrôles. Ces résultats suggèrent que l'hyperlipidémie serait la conséquence d'une accumulation de LDL dans le sang causée par la mutation du récepteur aux LDL, le LDL-R (Kita 1981). Le récepteur LDL-R muté ne lie plus les LDL qui ne sont alors plus captées et métabolisées au niveau du foie. Elles s'accumulent dans la circulation sanguine et dans la paroi des artères où elles induisent la formation de plaques d'athérome. La mutation est caractérisée en 1986 par Yamamoto et al. Il s'agit de la délétion de 12 nucléotides qui entraîne celle des 4 acides aminés 115 à 118 correspondants (asp-gly-ser-asp). Ces acides aminés font partie d'une séquence hautement conservée dans la troisième des sept régions répétées riches en cystéines qui sont impliquées dans la liaison du LDL-R aux apolipoprotéines E et B-100 des LDL. La mutation entraîne une déglycosylation du récepteur, et le poids moléculaire du récepteur muté est nettement diminué (PM = 100 kDa au lieu de 130 kDa). Bien que l'expression et la translocation de la protéine mutée soient normales, le LDL-R ne lie plus les LDL circulantes (Yamamoto 1986, Havel 1989).

Cette pathologie a également été décrite chez l'homme. Il s'agit de l'hypercholestérolémie familiale (HF). Le WHHL est donc un modèle animal pour cette pathologie (Brown 1975, Buja 1990).

Le WHHL développe spontanément des plaques d'athérome, et le développement de ces plaques s'accompagne d'importants phénomènes inflammatoires. Les lésions se développent graduellement de l'aorte thoracique proximale à l'aorte abdominale distale. Chez les animaux âgés d'un mois, les zones lipidiques de l'aorte thoracique proximale contiennent $0,7 \pm 0,3$ leucocytes par mm^2 , $0,3 \pm 0,2$ monocytes par mm^2 et aucune cellule spumeuse. Chez les WHHL âgés d'un an, l'inflammation est importante et les zones lipidiques de l'aorte thoracique proximale contiennent $47,8 \pm 7,4$ leucocyte par mm^2 , $25,9 \pm 6,8$ monocytes par mm^2 et $44,0 \pm 12,4$ cellules spumeuses par mm^2 (Clubb 2001). Le recrutement de ces cellules inflammatoires implique l'expression de VCAM-1. Cette expression a été mise en évidence par différentes équipes sur ce modèle animal (Cybulsky 1991, Iiyama 1999, Fruebis 1997). Fruebis et al. ont étudié l'expression de VCAM-1 en fonction de l'âge du WHHL. Ils ont observé une importante élévation de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 et de la protéine VCAM-1 chez le WHHL âgé de 18 mois (Fruebis 1997).

Le WHHL âgé de 18 mois environ constitue donc un modèle animal idéal pour l'imagerie de VCAM-1 au sein des plaques d'athérome. Ce modèle a été choisi pour la présente étude.

2. Protocoles

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique du Centre de Recherche et Service de Santé des Armées (CRSSA).

- Protocole 1 :

Le premier protocole est destiné à évaluer le comportement biologique de ^{125}I -B2702(R) et ^{125}I -B2702 pour la sélection du radiotraceur le plus intéressant pour l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable.

- Protocole 2 :

Le second protocole est destiné à évaluer le potentiel pour l'imagerie non invasive de VCAM-1 du motif peptidique retenu à l'issue du premier protocole et radiomarqué à l' ^{123}I et au $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

2.1 Protocole 1 : Evaluation de ^{125}I -B2702(R) et ^{125}I -B2702

Ce premier protocole de 30 minutes a été mis en œuvre afin de comparer les biodistributions des deux motifs peptidiques B2702 (monomérique) et B2702(R) (dimérique) radiomarqués à l'iode 125 (Figure 53).

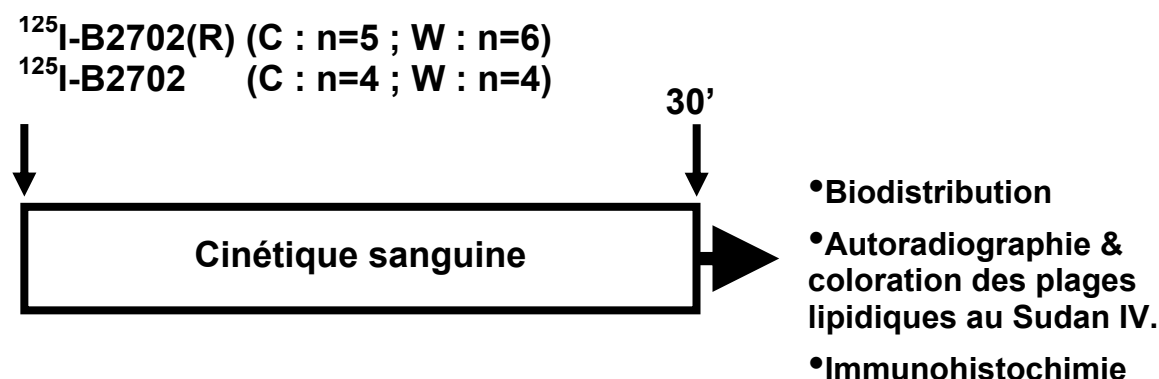


Figure 53. Protocole 1.

a. Animaux

Les lapins Watanabe (WHHL, n= 10) et les lapins contrôles « New Zealand White » (Contrôle, n = 9) sont originaires du Centre de Production Animale (Olivet, France). Les animaux du groupe WHHL sont âgés de $19,8 \pm 3,8$ mois et les animaux du groupe Contrôle de $18,3 \pm 1,0$ mois (p = NS).

b. Anesthésie

L'anesthésie est induite par une injection intramusculaire d'un mélange de xylazine (5 mg/kg) (Sigma) et de kétamine (35 mg/kg) préparé extemporanément. Des doses additionnelles du mélange anesthésiant sont ensuite injectées au cours de l'expérimentation à raison de 2 mg/kg/heure de xylazine et 14 mg/kg/heure de kétamine environ.

c. Cathétérisation

Deux cathéters sont insérés dans les veines de l'oreille, l'un pour l'administration du radiotraceur, et le second pour les prélèvements sanguins (Insyte-N 24G, Becton Dickinson). Après chaque prélèvement sanguin, le cathéter est rempli de liquide physiologique hépariné (250 UI/ml) afin de prévenir la coagulation sanguine.

d. Dosages plasmatiques

Avant l'initiation du protocole, 1 ml de sang est prélevé, centrifugé 2 minutes à 4000 RPM et le plasma est congelé pour la détermination ultérieure par méthode enzymatique des concentrations plasmatiques en triglycérides (TG) et en cholestérol total. La méthode enzymatique du dosage du cholestérol repose sur son hydrolyse par la cholestérol-estérase et celle des TG sur leur hydrolyse par une lipoprotéine-lipase de microorganisme (automate Roche/Hitachi, CHU Grenoble).

e. Injection du radiotraceur

Le radiotraceur est ensuite injecté dans une veine de l'oreille. La dose injectée (DI) est de 5 MBq/kg.

f. Cinétique sanguine

Des prélèvements sanguins sont réalisés à 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes suivant l'injection afin d'évaluer la cinétique sanguine des radiotraceurs.

g. Euthanasie

30 minutes après l'injection du radiotraceur, l'animal est euthanasié par injection intramusculaire d'une surdose d'anesthésique suivie d'une dose intraveineuse létale de 10 ml de KCl (10%).

h. Analyses post mortem

Ces analyses, communes aux deux protocoles et détaillées plus loin comportent une biodistribution, l'autoradiographie des aortes, la quantification des images autoradiographiques obtenues, la coloration des plaques d'athérome aortiques au Sudan IV et l'étude de l'expression de VCAM-1 dans les aortes thoraciques et dorsales en immunohistochimie.

2.2 Protocole 2 : Evaluation de ^{123}I -B2702, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702 et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702

Le motif peptidique B2702 est évalué lors d'un second protocole de 180 minutes après radiomarquage à l'iode 123 du motif linéaire (^{123}I -B2702) ou après radiomarquage au technétium 99m du motif linéaire ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702) ou du complexe RAFT sur lequel sont greffés 4 motifs B2702 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702) (Figure 54).

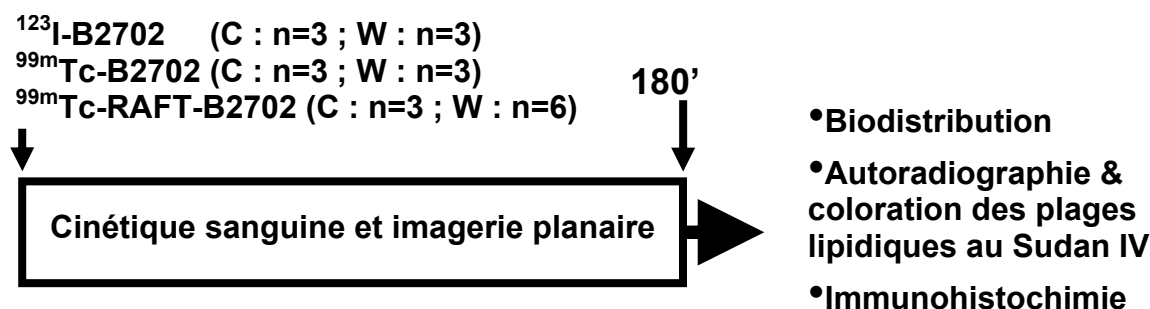


Figure 54. Protocole 2.

a. Animaux

Les lapins Watanabe (WHHL, n= 12) et les lapins contrôles « New Zealand White » (Contrôle, n = 9) sont originaires du Centre de Production Animale (Olivet, France). Les animaux du groupe WHHL sont âgés de $19,4 \pm 1,7$ mois et les animaux du groupe Contrôle de $16,7 \pm 0,8$ mois (p = NS).

b. Anesthésie, cathétérisation et dosages plasmatiques.

Ces trois étapes du protocole 2 sont identiques au protocole 1 (Chap IV-A-2.1, b à d).

c. Imagerie planaire par détection de simple photon

Les biodistributions des radiotraceurs sont évaluées en imagerie planaire avec une gamma-caméra dédiée à l'homme (SoftCam, DSX rectangular). L'imagerie planaire corps entier est réalisée en face latérale gauche.

La séquence d'acquisition est la suivante :

- 60 acquisitions de 2 secondes durant les 2 premières minutes d'acquisition. Cette séquence permet de visualiser le premier passage des radiotraceurs dans le compartiment sanguin et donc de localiser l'emplacement de l'aorte.
- 58 acquisitions de 2 minutes à 1 heure post-injection.
- 24 acquisitions de 5 minutes de 1 heure à 3 heures post-injection.

d. Injection du radiotraceur

Le radiotraceur est injecté à l'animal sous la gamma-caméra juste après le lancement de l'acquisition. L'injection est réalisée dans une veine de l'oreille. La dose injectée (DI) est de 18,5 MBq/kg. Cette dose est supérieure à celle du protocole 1 afin d'optimiser la détection externe avec la gamma-caméra.

e. Cinétique sanguine

Des prélèvements sanguins sont réalisés à 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 et 180 minutes suivant l'injection des radiotraceurs afin d'évaluer leur cinétique sanguine.

f. Euthanasie

30 minutes après l'injection du radiotraceur, l'animal est euthanasié par injection intramusculaire d'une surdose d'anesthésique suivie d'une dose intraveineuse létale de 10 ml de KCl (10%).

g. Analyses post mortem

Ces analyses, communes aux deux protocoles et détaillées plus loin comportent une biodistribution, l'autoradiographie des aortes, la quantification des images autoradiographiques obtenues, la coloration des plaques d'athérome aortiques au Sudan IV et l'étude de l'expression de VCAM-1 dans les aortes thoraciques et dorsales en immunohistochimie.

2.3 Analyses post-mortem

a. Biodistribution et cinétique sanguine

Des prélèvements de cœur, poumon, foie, rate, rein, aorte thoracique, muscle squelettique, graisse abdominale et estomac sont rincés et pesés. Un prélèvement sanguin est également réalisé et pesé. La radioactivité contenue dans les prélèvements tissulaires et sanguins est déterminée à l'aide d'un compteur gamma (Cobra II, Packard Instruments, Rungis, France). Les fenêtres d'énergie utilisées pour ces mesures sont les suivantes : ^{125}I , 15-75 keV ; ^{123}I , 85-200 keV ; $^{99\text{m}}\text{Tc}$, 100-168 keV. Les activités sanguines et tissulaires sont exprimées en pourcentage de la dose injectée captée par gramme d'organe (%DI/g).

b. Autoradiographie

Immédiatement après l'euthanasie, les aortes thoraciques et abdominales sont prélevées et placées dans une solution de formaline à 10% (Accustain[®], Sigma-Aldrich). Le tissu conjonctif est délicatement retiré puis les aortes sont ouvertes longitudinalement. Elles sont alors placées sur un support cartonné, recouvertes d'un film plastique (Saran) et mises au contact d'un film de phospho-imager (Fujifilm 08SR2025) pour une durée de 18 heures. Les films sont scannés à l'aide d'un phospho-imager (Fujifilm BAS 5000).

c. Coloration des aortes au Sudan IV

Le Sudan IV est un colorant rouge lipophile. Il est donc soluble dans les plages lipidiques des plaques d'athérome et permet leur visualisation.

Après l'acquisition des images autoradiographiques, les aortes sont immergées 10 minutes dans une solution de Sudan IV (0,2% dans un mélange 1/1 éthanol 70%/acétone). Les aortes sont ensuite plongées 5 minutes dans une solution d'éthanol à 50% afin de décolorer les zones non lipidiques.

d. Quantification des images autoradiographiques

Les images autoradiographiques précédemment obtenues sont quantifiées à l'aide du logiciel associé au scanner du phospho-imager (Image-Gauge, Fuji). Des zones d'intérêt sont tracées manuellement et l'activité du radiotraceur, exprimée en intensité d'excitation des cellules du

film par unité de surface (« Phospho-Stimulated Luminescence » ou PSL/mm²) est déterminée. L'activité est ensuite normalisée à la dose injectée (DI) exprimée en µCi/kg (PSL/mm²/DI).

L'excitation du film du phospho-imager, et donc la valeur de PSL, est dépendante du radio-isotope utilisé. En conséquence, il n'est pas possible de comparer directement les valeurs d'activités obtenues avec les isotopes ^{99m}Tc, ¹²³I, ou ¹²⁵I. Les comparaisons sont donc effectuées sur la valeur des rapports d'activité entre les différentes zones définies à la surface des aortes.

(a) Groupe WHHL

En accord avec la coloration au Sudan IV, 3 régions d'intérêt sont définies dans des régions lipidiques colorées au Sudan IV (Sudan IV-positives) et 3 régions d'intérêt sont définies dans des régions non colorées (Sudan IV-négatives). Enfin, 3 régions d'intérêt sont définies en dehors de l'aorte afin de quantifier le bruit de fond.

(b) Groupe Contrôle

6 régions d'intérêts sont définies tout au long de la surface de l'aorte. De même que pour le groupe WHHL, 3 régions d'intérêt sont définies en dehors de l'aorte afin de quantifier le bruit de fond.

e. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les comparaisons des dosages plasmatiques, des biodistributions et des quantifications autoradiographiques sont réalisées avec un test de Mann et Whitney. Les comparaisons des cinétiques sanguines entre les groupes Contrôles et WHHL sont réalisées avec un test ANOVA. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

f. Histologie et Immunohistochimie

Des prélèvements d'aortes thoraciques et abdominales sont placés 24 heures dans l'AFA (Alcool Formolé Acétique). Après déshydratation par des bains successifs d'éthanol de 70 à 100% puis de xylène, les échantillons sont inclus dans la paraffine. Des séries de 5 coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à intervalles réguliers.

(a) Histologie

Afin de bien visualiser les structures, une coloration trichrome standard (HES : hématoxyline, éosine, safran) est réalisée sur la première coupe à l'aide d'un automate. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu, l'éosine colore le cytoplasme en rose et le safran colore le tissu conjonctif en jaune-orangé.

(b) Immunohistochimie

Les coupes adjacentes sont utilisées afin d'étudier la présence de VCAM-1 par immunohistochimie. Des colorations contrôles sont réalisées en l'absence de l'anticorps primaire anti-VCAM-1 afin de s'assurer que la coloration formée par l'anticorps secondaire est spécifique.

- Les lames sont déparaffinées et réhydratées

Chaque bain dure 5 min : 2x xylène, 2x éthanol absolu, 2x éthanol 95%, 2x éthanol 70%, 2x H₂O ultrapure.

- L'activité des peroxydases endogènes est détruite

Solution : 200 mL méthanol + 3 mL de peroxyde d'hydrogène (30%)

Les lames sont incubées avec cette solution dans un bain à lame pendant 30 min à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées dans un bain d'H₂O ultrapure.

- démasquage des sites antigéniques

Solution : 320 mL H₂O ultrapure + 3 mL de solution de démasquage (Vector Labs)

Les lames sont incubées avec cette solution dans un bain à lame couvert 20 min au micro-ondes (360 Watts). Le niveau est refait régulièrement avec de l'eau distillée afin que les lames soient toujours immergées (5, 9, 13, 17, 19 min). Le bain est ensuite placé à refroidir 1 heure à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées dans une solution de FSGO 0,5% (« Gelatin from cold water fish skin », Sigma) durant 5 minutes à température ambiante.

- Bloquage de l'avidine endogène

Solution : 1 mL PBS/FSGO, 100 µL de sérum de cheval, 4 gouttes de la solution de bloquage à l'avidine (Vector Labs).

Les coupes sont entourées avec un stylo hydrophobe (Dakopen, Dako) puis la solution de bloquage est ajoutée et incubée 1 heure à température ambiante dans une chambre humidifiée.

- Incubation de l'anticorps primaire. (1:500)

Solution pour 4 lames : Anticorps primaire de chèvre anti-VCAM-1 (5µl) (Santa Cruz Biotechnology), PBS/FSGO (1 ml), Sérum (100 µl), Solution de blocage de la biotine (4 gouttes) (Vector Labs).

Les lames sont incubées dans cette solution pendant une nuit à 4°C dans une chambre humide. La solution est ensuite aspirée et les lames sont rincées 2 fois pendant 5 minutes dans des bains de PBS/FSGO.

- Incubation de l'anticorps secondaire:

Solution : 5 µl d'anticorps secondaire (Anticorps de cheval anti IgG de chèvre, Vector labs BA-9500 – 5 µg/mL), 50 µl de sérum, 1 mL de FSGO/PBS.

L'anticorps est incubé 1 heure à température ambiante en chambre humidifiée, puis les lames sont lavées 5 minutes dans le PBD/FSGO à température ambiante.

- Complexation biotine/peroxidase avec la solution ABC en kit

Solution : 1 mL de PBS, 20 µL de solution A, 20 µL de solution B (Vector Labs : Vector PK 6100 Elite standard).

La solution est ajoutée sur les lames pendant 30 minutes à température ambiante. Puis les lames sont lavées dans le PBS 5 minutes à température ambiante.

- Coloration du complexe d'anticorps avec le chromogène (DAKO S-3000)

Solution : 10 mL de PBS, 1 tablette de DAB, 7,5 µL H₂O₂ (30%)

Cette solution est ajoutée sur les coupes pendant 5 min à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées avec de l'eau distillée 5 minutes à température ambiante.

- Coloration à l'hématoxyline

Solution : l'hématoxyline est filtrée (#1 Whatman)

Les lames sont incubées dans un bain d'hématoxyline pendant 4-5 min à température ambiante.

- Montage des lames

Les lames sont déshydratées par des bains successifs de 5 min : 3X éthanol absolu puis 2x xylène. Les surlames sont ensuite montées avec un liquide de montage organique.

B. Résultats

1. Validation du modèle expérimental

1.1 Dosages plasmatiques

	Groupe Contrôle	Groupe WHHL
	(n = 18)	(n = 22)
Cholestérol (g/l)	0,42 ± 0,03	6,52 ± 0,32***
Triglycérides (g/l)	0,38 ± 0,03	2,67 ± 0,36***

Tableau 7. Dosages plasmatiques.

***p < 0,001 par rapport au groupe Contrôle.

La concentration plasmatique en cholestérol des lapins WHHL est environ seize fois supérieure à celle des lapins Contrôles : 6,52 ± 0,32 g/l versus 0,42 ± 0,03 g/l (p < 0,001), et leur concentration en triglycérides plasmatiques est environ 8 fois plus élevée : 0,38 ± 0,03 g/l versus 2,670 ± 0,036 g/l (p < 0,001) (Tableau 7).

1.2 Coloration au Sudan IV

Aucune lésion athérosclérotique n'est visible sur les aortes des animaux du groupe Contrôle après coloration au Sudan IV. En revanche, des lésions athérosclérotiques riche en lipides, donc rouge après coloration (Sudan IV-positives), sont clairement observées sur les aortes des animaux du groupe WHHL (Figure 55). Dans ce groupe, la densité des lésions diminue de la région proximale à la région distale de l'aorte. La crosse aortique est presque entièrement recouverte de plaques d'athérome Sudan IV-positives. Les lésions sur les aortes thoracique et abdominale sont principalement observées au niveau des bifurcations artérielles.

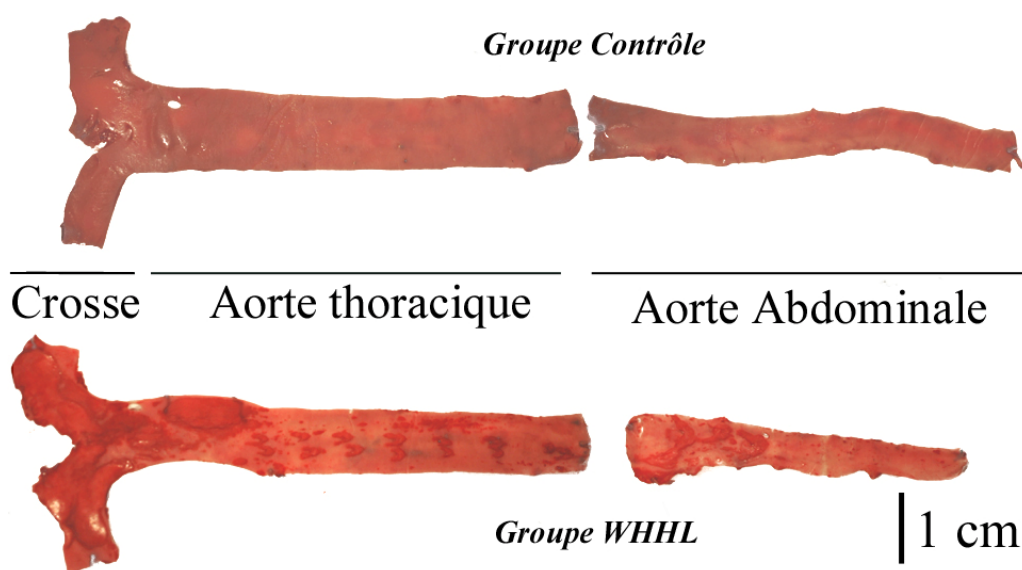


Figure 55. Exemple de coloration de l'aorte au Sudan IV.

Les plaques d'athérome lipidiques des aortes des lapins du groupe WHHL apparaissent en rouge. Elles sont localisées au niveau de la crosse aortique et des bifurcations artérielles.

1.3 Histochimie et immunohistochimie

Sur la figure 56 sont présentées la coloration trichrome standard (A à C) et l'immunohistochimie de VCAM-1 (D à I) réalisées sur des aortes d'animaux du groupe Contrôle (D et G) et des aortes d'animaux WHHL, soit au niveau des régions Sudan IV-négatives (E et H), soit au niveau des régions Sudan IV-positives (F et I). La spécificité du marquage réalisé avec les anticorps primaire et secondaire (G à I) est confirmée par l'absence de coloration en l'absence de l'anticorps primaire (D, E et F).

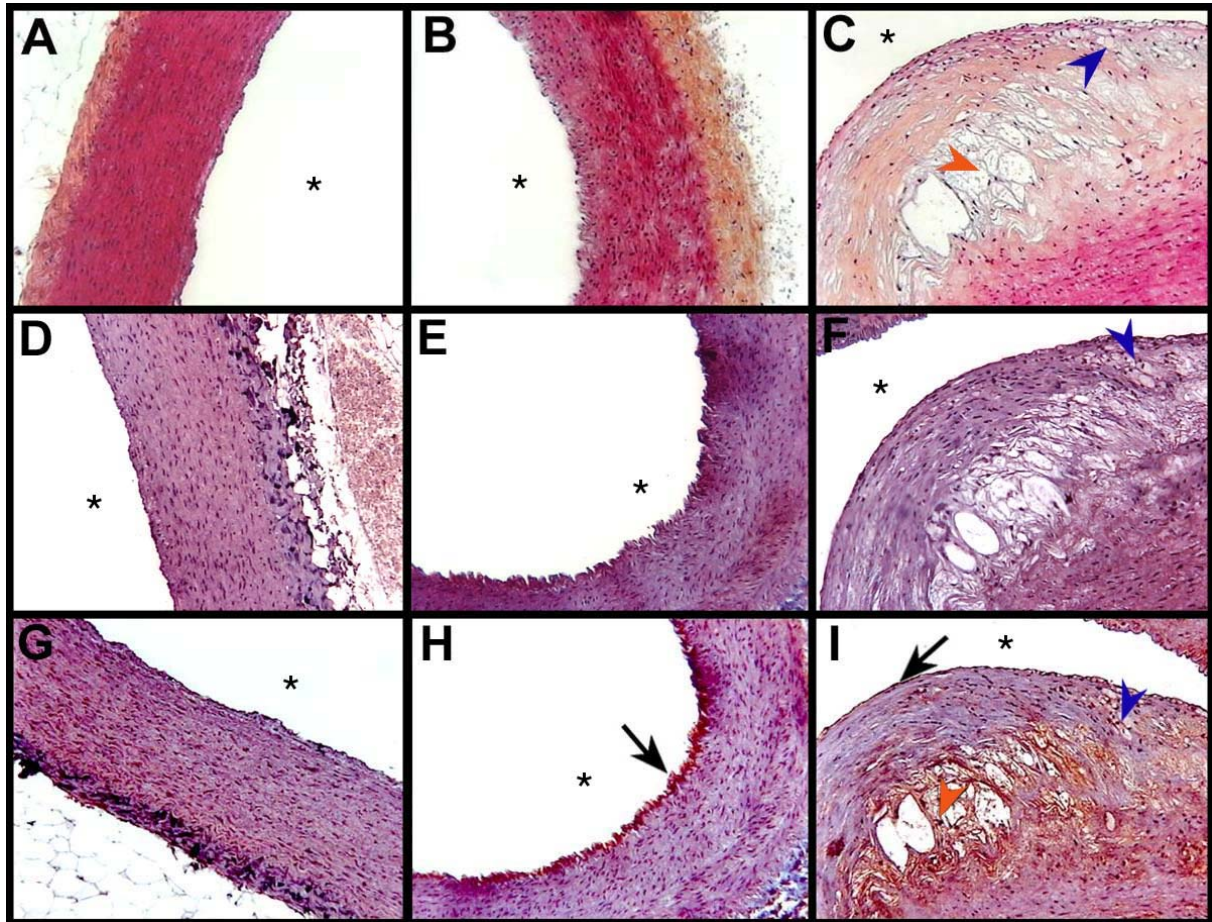


Figure 56. Immunohistochimie.

Coupes transversales d'aortes d'animaux Contrôles (A, D et G) et WHHL dans les régions Sudan IV-négatives (B, E et H) et positives (C, F et I). A à E : coloration trichrome standard HES. D à F : colorations immunohistochimique contrôle en absence de l'Ac primaire. G à I : coloration immunohistochimique (VCAM-1 apparaît en coloration brune). * : lumière vasculaire. Flèche : localisation de VCAM-1 sur l'endothélium ; tête de flèche orange : plage lipidique et nécrotique ; tête de flèche bleue : cellules spumeuses.

a. Animaux Contrôles

(a) Coloration trichrome

Aucun épaissement de la paroi des artères thoracique et abdominale n'est observé chez les animaux du groupe Contrôle. L'endothélium apparaît régulier (A).

(b) Immunohistochimie

Aucune expression de VCAM-1 n'a été observée dans les aortes des animaux du groupe Contrôle (G).

b. Animaux WHHL - régions Sudan IV-négatives

(a) Coloration trichrome

Aucun épaissement de la paroi des artères thoracique et abdominale n'est observé au niveau des régions Sudan IV-négatives. En revanche, l'endothélium apparaît plissé et irrégulier (B).

(b) Immunohistochimie

L'expression de VCAM-1 est observée au niveau de l'endothélium des régions Sudan IV-négatives des aortes de lapins WHHL (H).

c. Animaux WHHL - régions Sudan IV-positives

(a) Coloration trichrome

Des épaissements des aortes thoracique et abdominale sont observés au niveau des régions Sudan IV-positives des animaux du groupe WHHL. Ces régions correspondent à des lésions athérosclérotiques avancées. Elles contiennent un large corps lipidique (tête de flèche orange) recouvert par une capsule fibreuse qui apparaît colorée en orangé par le safran. On distingue également la présence de larges cellules localisées entre l'endothélium et la région fibreuse, probablement des cellules spumeuses dérivées de macrophages ou de cellules musculaires lisses (tête de flèche bleue) (C).

(b) Immunohistochimie

La présence de la protéine VCAM-1 au niveau de ces lésions Sudan IV-positives est mise en évidence par immunohistochimie. VCAM-1 est exprimée au niveau de l'endothélium qui recouvre les lésions athérosclérotiques des aortes thoracique et abdominale (flèche), mais également dans la plaque au niveau des couches profondes de l'intima, dans le corps nécrotique (tête de flèche orange) et au niveau des cellules spumeuses (tête de flèche bleue) (I).

2. Evaluation de ^{125}I -B2702(R) et de ^{125}I -B2702

Les peptides B2702 (monomérique) et B2702(R) (dimérique) sont comparés à l'aide du protocole 1 (Chap IV A 2.1).

2.1 Cinétique sanguine

Les cinétiques sanguines de ^{125}I -B2702(R) et de ^{125}I -B2702 sont présentées sur la figure 57. Aucune différence significative n'est observée entre les animaux Contrôles et WHHL. L'activité sanguine des traceurs suit une décroissance exponentielle, avec un $T_{1/2} = 2,5$ min pour les deux traceurs. L'activité circulante en ^{125}I -B2702(R) et de ^{125}I -B2702 30 minutes après l'injection représente $34,7 \pm 1,9$ % et $44,6 \pm 1,2$ % de l'activité initiale à 1 min, respectivement ($P < 0,05$). A 30 minutes, l'activité circulante de ^{125}I -B2702 est 3 fois plus élevée que celle de ^{125}I -B2702(R) ($p < 0,05$).

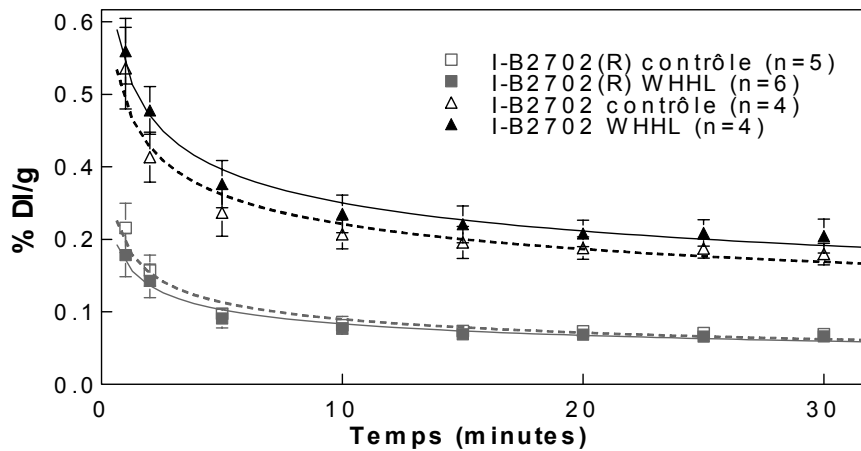


Figure 57. Cinétiques sanguines de I-B2702(R) et I-B2702.

2.2 Biodistribution

Organes	¹²⁵ I-B2702(R)		¹²⁵ I-B2702	
	Contrôle (n = 5)	WHHL (n = 6)	Contrôle (n = 4)	WHHL (n = 4)
Sang	0,083±0,012	0,079±0,013	0,270±0,006	0,303±0,029
Coeur	0,043±0,011	0,045±0,007	0,108±0,007	0,120±0,011
Aorte	0,010±0,003	0,026±0,005	0,027±0,006	0,057±0,016 *
Poumons	7,095±2,765	9,104±2,127	0,343±0,096	0,217±0,019
Foie	0,414±0,147	0,331±0,053	0,148±0,009	0,174±0,013
Rate	0,783±0,352	0,476±0,180	0,100±0,006	0,125±0,011
Reins	0,355±0,145	0,250±0,054	0,391±0,065	0,518±0,064
Graisse	0,007±0,002	0,009±0,001	0,029±0,006	0,018±0,003
Muscle	0,014±0,003	0,010±0,002	0,044±0,003	0,041±0,002
Estomac	0,049±0,007	0,038±0,007	0,119±0,009	0,121±0,017

Tableau 8. Biodistributions de ¹²⁵I-B2702(R) et de ¹²⁵I-B2702 30 minutes après injection des traceurs (% dose injectée (DI)/gramme). *p < 0,05.

Les biodistributions de ¹²⁵I-B2702 et de ¹²⁵I-B2702(R), réalisées 30 minutes après l'injection du traceur chez les animaux Contrôles et WHHL, sont représentées dans le tableau 8. Au niveau de l'aorte, les fixations de ¹²⁵I-B2702 et de ¹²⁵I-B2702(R) sont 2 à 2,5 fois supérieures chez les lapins WHHL que chez les lapins Contrôles, et cette différence est significative pour I-B2702 ($P < 0,05$ vs. Contrôle).

En comparant les biodistributions de ¹²⁵I-B2702 et de ¹²⁵I-B2702(R) dans les autres organes étudiés, aucune différence significative n'est observée entre les animaux Contrôles et WHHL. I-B2702(R) présente une radioactivité pulmonaire extrêmement élevée aussi bien chez les lapins Contrôles que chez les lapins WHHL ($7,1 \pm 2,8$ %DI/g et $9,1 \pm 2,1$ %DI/g, respectivement, $P = \text{NS}$). Cette fixation pulmonaire a également été visualisée *in vivo* en imagerie planaire à l'aide d'une gamma-camera dédiée au petit animal positionnée sur la région thoracique (gamma-imager, Biospace) (Figure 58). Dans ces études préliminaires, la fixation pulmonaire de ¹²⁵I-B2702(R) persistait pendant au moins 24 heures. Enfin, I-B2702(R) est principalement excrété par la voie hépatobiliaire, alors que I-B2702 est principalement éliminé par les reins.

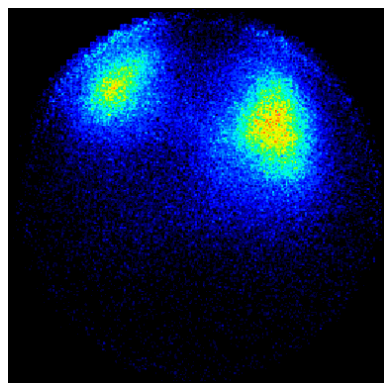


Figure 58. Imagerie planaire.

La gamma-caméra est positionnée sur la région thoracique d'un lapin WHHL. Sur l'image ci-contre, obtenue entre 25 et 30 minutes après l'injection de I- B2702(R), les poumons sont nettement visibles.

2.3 Stabilité

La pureté radiochimique des 2 radiotraceurs iodés dans le sang à 30 minutes est supérieure à 70% (Figure 59).

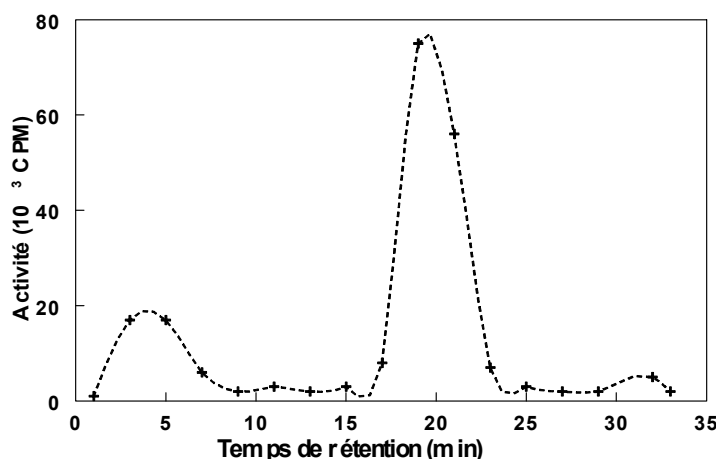


Figure 59. Exemple de résultat d'HPLC obtenu avec I-B2702.

Le pic à 5 minutes correspond à l'iode libre et le pic majoritaire à 19 minutes à I-B2702. La pureté radiochimique est de 78%.

2.4 Autoradiographie

Des exemples représentatifs d'autoradiographies (B et D), et les coloration au Sudan IV correspondantes (A et C) sont présentés sur la figure 60. Les aortes des lapins Contrôles ne présentent pas de coloration lipidique (A) et les fixation de I-B2702(R) et I-B2702, visibles sur les images autoradiographiques correspondantes, sont faibles et homogènes (B). Des lésions athérosclérotiques Sudan IV-positives sont observées sur l'aorte des lapins WHHL (C). Il existe une excellente corrélation entre les régions Sudan IV-positives et les

localisations des deux radiotraceurs I-B2702(R) et I-B2702 déterminées par imagerie autoradiographique *ex vivo* (D).

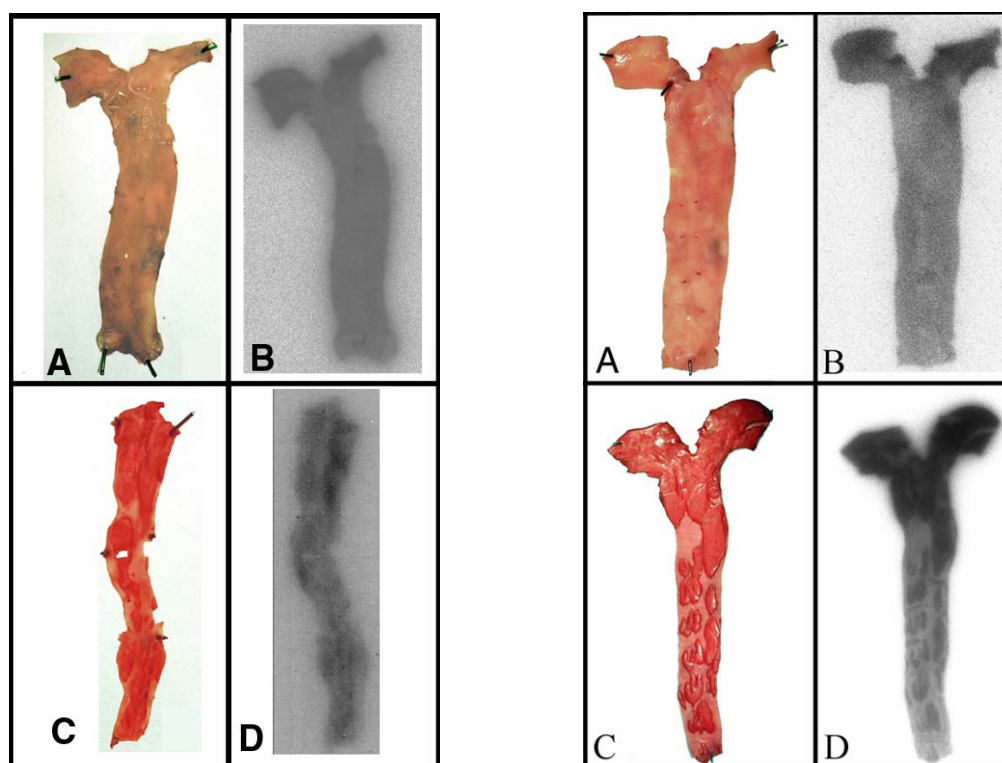


Figure 60. Exemples d'autoradiographies.

A gauche : exemples d'autoradiographies obtenues avec I-B2702(R) au niveau des aortes thoraciques d'un animal Contrôle (B) et abdominale d'un WHHL (D). Les colorations des plages lipidiques au Sudan IV correspondantes sont également représentées (A et C).

A droite : exemples d'autoradiographies obtenues avec I-B2702 au niveau de l'aorte thoracique d'un animal Contrôle (B) et d'un WHHL (D). Les colorations des plages lipidiques au Sudan IV correspondantes sont également représentées (A et C).

2.5 Quantification des autoradiographies

Les résultats des quantifications des images autoradiographiques sont présentés sur les figures 61 et 62. Les valeurs présentées, exprimées en PSL/mm², tiennent compte de la normalisation à la dose injectée. Les rapports de fixation entre les groupes WHHL et Contrôle sont représentés sur la figure 63.

Dans les régions Sudan IV-positives correspondant aux plaques d'athérome évoluées des aortes des lapins du groupe WHHL, la fixation de I-B2702(R) est de $1,30 \pm 0,31$ PSL/mm² et

celle de I-B2702 est de $2,37 \pm 0,40$ PSL/mm² (Figures 61 et 62 respectivement). Ces valeurs sont 3,6 et 21,6 fois supérieures à celles obtenues dans les aortes du groupe Contrôle ($0,36 \pm 0,13$ PSL/mm² et $0,11 \pm 0,03$ PSL/mm², respectivement, $P < 0,05$ pour les deux comparaisons) (Figure 63). De plus, les fixations de I-B2702(R) et de I-B2702 dans les régions Sudan IV-positives sont significativement supérieures à celles observées dans les régions Sudan IV-négatives ($0,51 \pm 0,16$ PSL/mm² et $0,73 \pm 0,04$ PSL/mm² respectivement, $P < 0,05$ pour chaque animal du groupe WHHL). Enfin, la fixation de I-B2702 est significativement plus élevée dans les régions Sudan IV-négatives des aortes du groupe WHHL que dans les aortes du groupe Contrôle ($P < 0,05$).

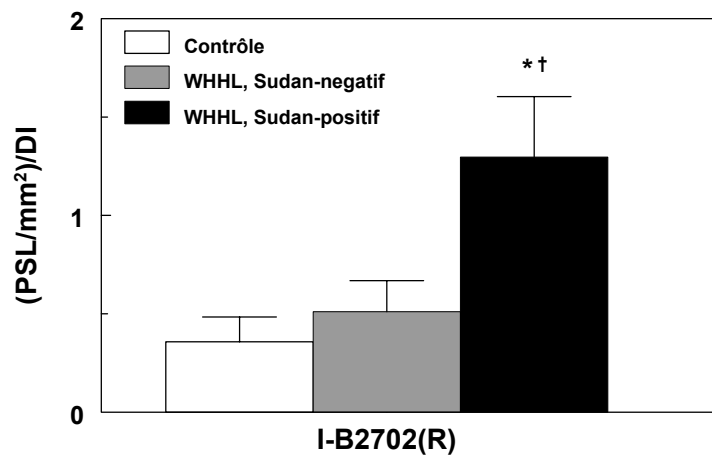


Figure 61. Fixation de I-B2702(R) à 30 min au niveau de l'aorte dorsale. $P < 0,05$ par rapport aux régions Contrôles (*) et Sudan IV-négatives (†).

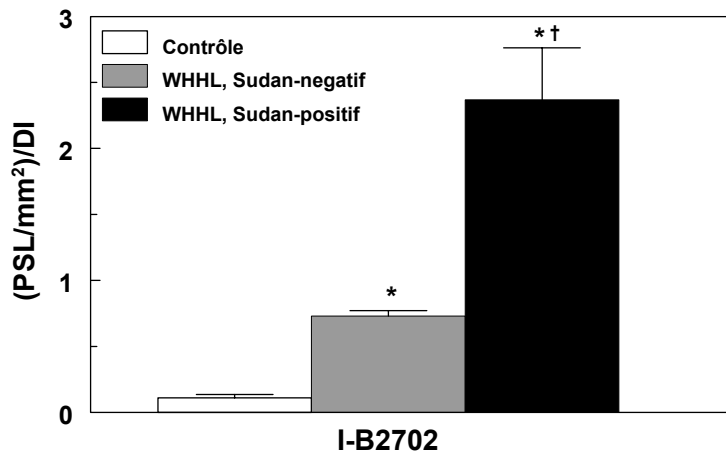


Figure 62. Fixation de I-B2702 à 30 min au niveau de l'aorte dorsale. $P < 0,05$ par rapport aux régions Contrôles (*) et Sudan IV-négatives (†).

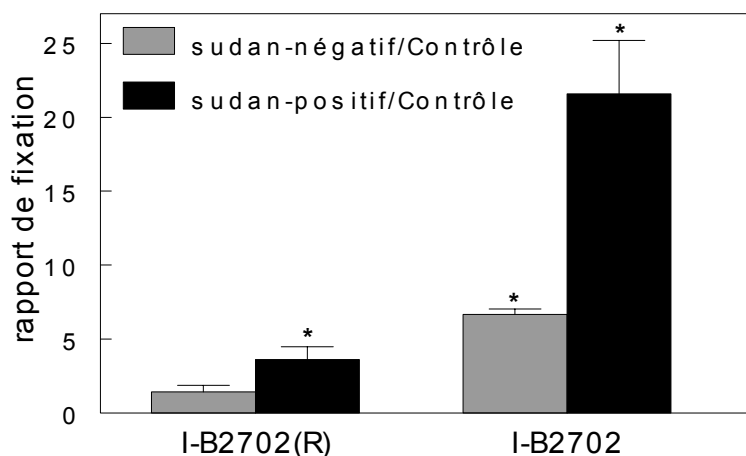


Figure 63. Rapports des fixations de I-B2702(R) et I-B2702 entre les groupes WHHL et Contrôle. * $P < 0,05$.

3. Evaluation de ^{123}I -B2702, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702 et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702

Le motif peptidique B2702 est évalué après radiomarquage à l'iode 123 ou au technétium $^{99\text{m}}$ suivant le protocole 2 (Chap IV.A.2.2).

3.1 Cinétique sanguine

Les cinétiques sanguines de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 sont représentées sur la figure 64 (A et B). Aucune différence significative n'est observée entre les animaux Contrôles et WHHL. Les cinétiques sanguines sont de type bi-exponentiel, avec une composante initiale rapide ($T_{1/2} = 2\text{-}4$ min pour les trois traceurs) suivie d'une composante lente ($T_{1/2} = 600$ min pour I-B2702, 120 min pour Tc-B2702 et 100 min pour Tc-RAFT-B2702). 180 minutes après l'injection des traceurs, les activités circulantes de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 représentent $32,9 \pm 3,5$ %, $12,8 \pm 1,8$ % et $53,5 \pm 2,7$ % de l'activité initiale à 1 min ($P < 0,05$).

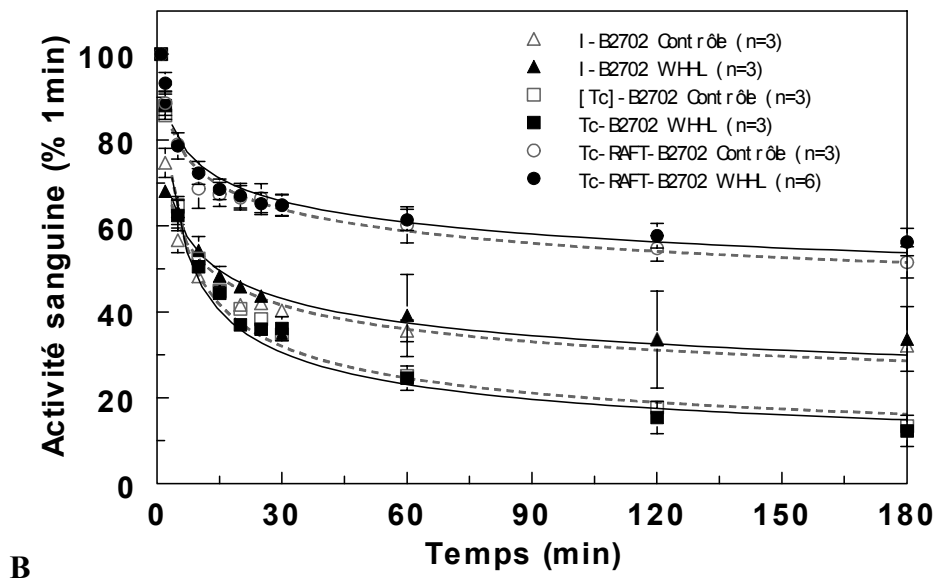
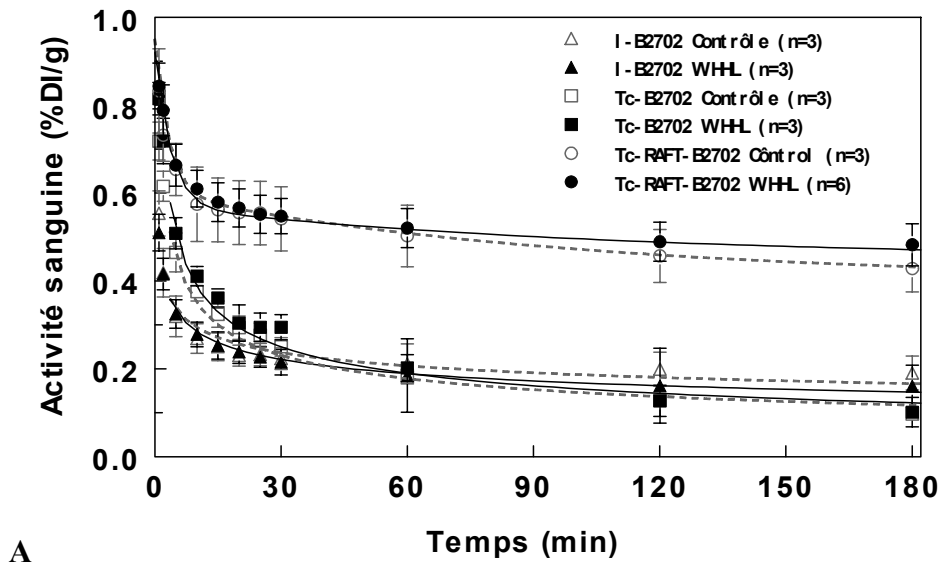


Figure 64 A et B. Cinétiques sanguines de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702.

A : en pourcentage de la dose injectée par gramme de sang

B : en pourcentage de l'activité initiale à 1 minute.

3.2 Biodistribution

A 180 minutes, les radioactivités aortiques de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 sont respectivement 3,1 fois, 1,8 fois et 1,6 fois plus élevées chez les animaux WHHL que chez les animaux du groupe Contrôle, mais cette différence n'est pas significative ($P = 0,13$; $P = 0,15$ et $P = 0,12$ respectivement). Au niveau des autres organes prélevés au cours de la biodistribution, aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes d'animaux, aussi bien pour I-B2702 que pour Tc-B2702. En revanche, la fixation au niveau de la graisse de Tc-RAFT-B2702 est plus élevée chez les animaux du groupe WHHL que chez les animaux du groupe Contrôle ($P < 0,05$). De plus, la fixation pulmonaire de Tc-RAFT-B2702 est plus élevée que celle des deux autres traceurs (10 fois supérieure à celle de I-B2702 et 7 fois supérieure à Tc-B2702). Les trois radiotraceurs sont principalement éliminés par les reins (Tableau 9).

Organes	¹²³ I-B2702		^{99m} Tc-B2702		^{99m} Tc-RAFT-B2702	
	Contrôle (n=3)	WHHL (n=3)	Contrôle (n=3)	WHHL (n=3)	Contrôle (n=3)	WHHL (n=6)
Sang	0,190±0,038	0,161±0,048	0,097±0,017	0,102±0,033	0,428±0,053	0,482±0,048
Coeur	0,088±0,017	0,088±0,031	0,029±0,008	0,044±0,015	0,121±0,014	0,126±0,013
Aorte	0,011±0,004	0,034±0,012	0,025±0,009	0,046±0,012	0,052±0,004	0,083±0,014
Poumons	0,138±0,028	0,163±0,044	0,166±0,052	0,208±0,044	1,509±0,242	1,379±0,485
Foie	0,086±0,025	0,096±0,029	0,427±0,080	0,332±0,042	1,239±0,259	1,071±0,120
Rate	0,076±0,015	0,089±0,029	0,198±0,061	0,172±0,070	0,422±0,082	0,527±0,277
Reins	0,307±0,052	0,490±0,184	0,558±0,109	1,361±0,721	1,171±0,078	1,588±0,153
Graisse	0,011±0,001	0,015±0,006	0,012±0,001	0,019±0,009	0,014±0,003	0,025±0,003*
Muscle	0,028±0,003	0,026±0,009	0,008±0,002	0,017±0,003	0,013±0,002	0,024±0,004
Estomac	0,095±0,025	0,114±0,040	0,045±0,009	0,052±0,015	0,079±0,003	0,128±0,009

Tableau 9. Biodistribution de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 180 minutes après l'injection des traceurs (%DI/g) (* P < 0,05 vs Contrôle).

Les rapports de fixation entre l'aorte et le sang sont inférieurs à 1. Pour I-B2702, ce rapport est multiplié par 3 entre les groupes Contrôle et WHHL ($0,07 \pm 0,03$ versus $0,20 \pm 0,02$; $P < 0,05$). Pour Tc-B2702, ce rapport est multiplié par 2 entre les groupes Contrôle et WHHL ($0,24 \pm 0,06$ versus $0,45 \pm 0,04$; $P < 0,05$) (Figure 65).

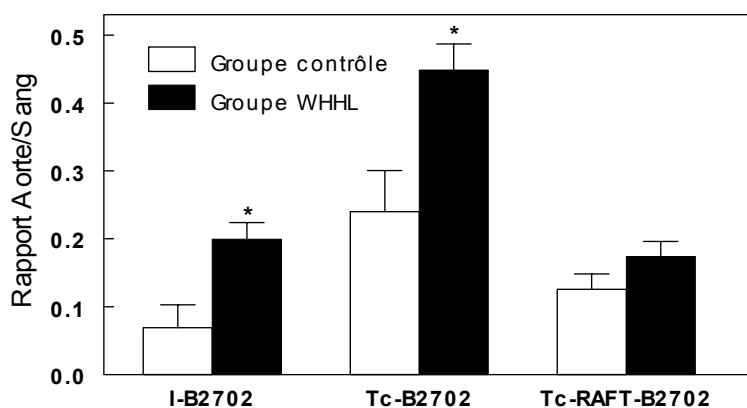


Figure 65. Rapport des fixations aortique et sanguine de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702. * $P < 0,05$ par rapport au groupe Contrôle.

3.3 Stabilité

La pureté radiochimique des trois radiotraceurs dans le sang à 180 minutes est supérieure à 70% (Figure 66).

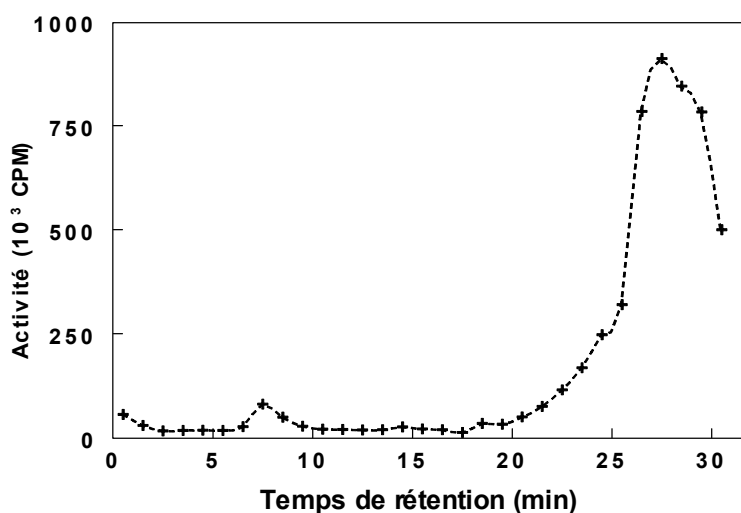


Figure 66. Exemple de résultat d'HPLC obtenue à 3 heures avec Tc-RAFT-B2702.

Le pic à 7 minutes correspond au technétium et au complexe technétié libres et les pics majoritaires à 26,5 et 28,5 minutes à deux isomères du Tc-RAFT-B2702. La pureté radiochimique est de 93 %.

3.4 Imagerie planaire

Un exemple d'imagerie scintigraphique planaire par détection de simples photons est représenté sur la figure 67. La première séquence d'acquisition permet de visualiser les aortes thoracique et abdominale mais ces structures ne sont plus visibles aux temps ultérieurs. Sur les images obtenues aux temps longs, on distingue le foie, les reins, la rate ainsi que la vessie. De plus, l'activité circulante est élevée et permet de distinguer avec précision le contour de l'organisme.

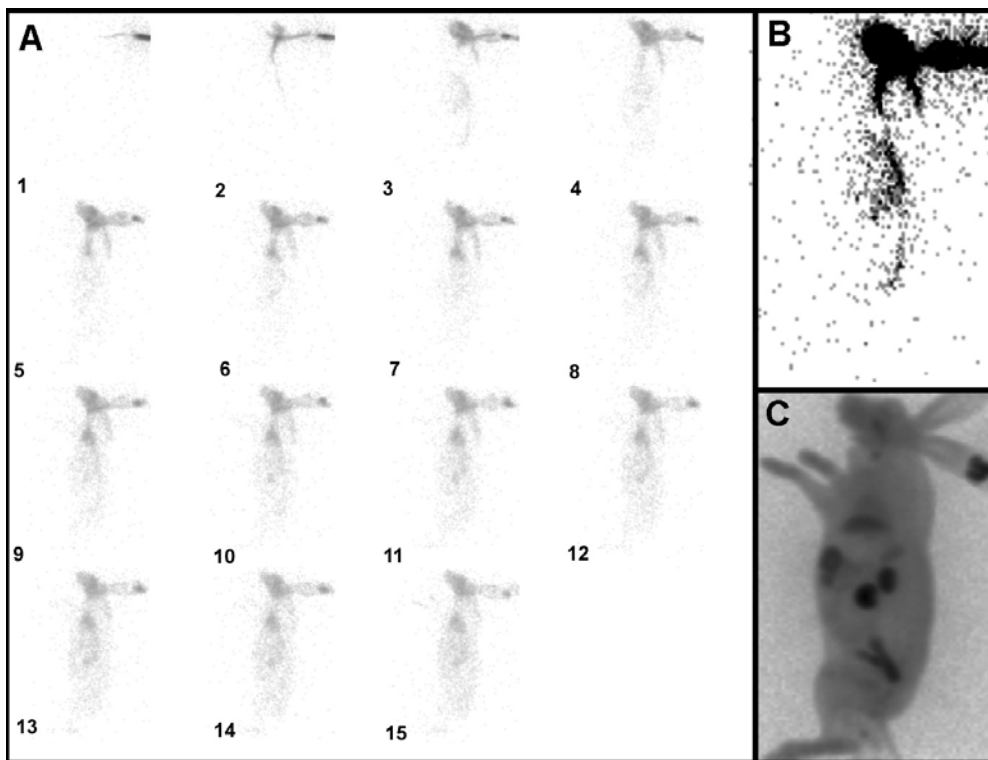
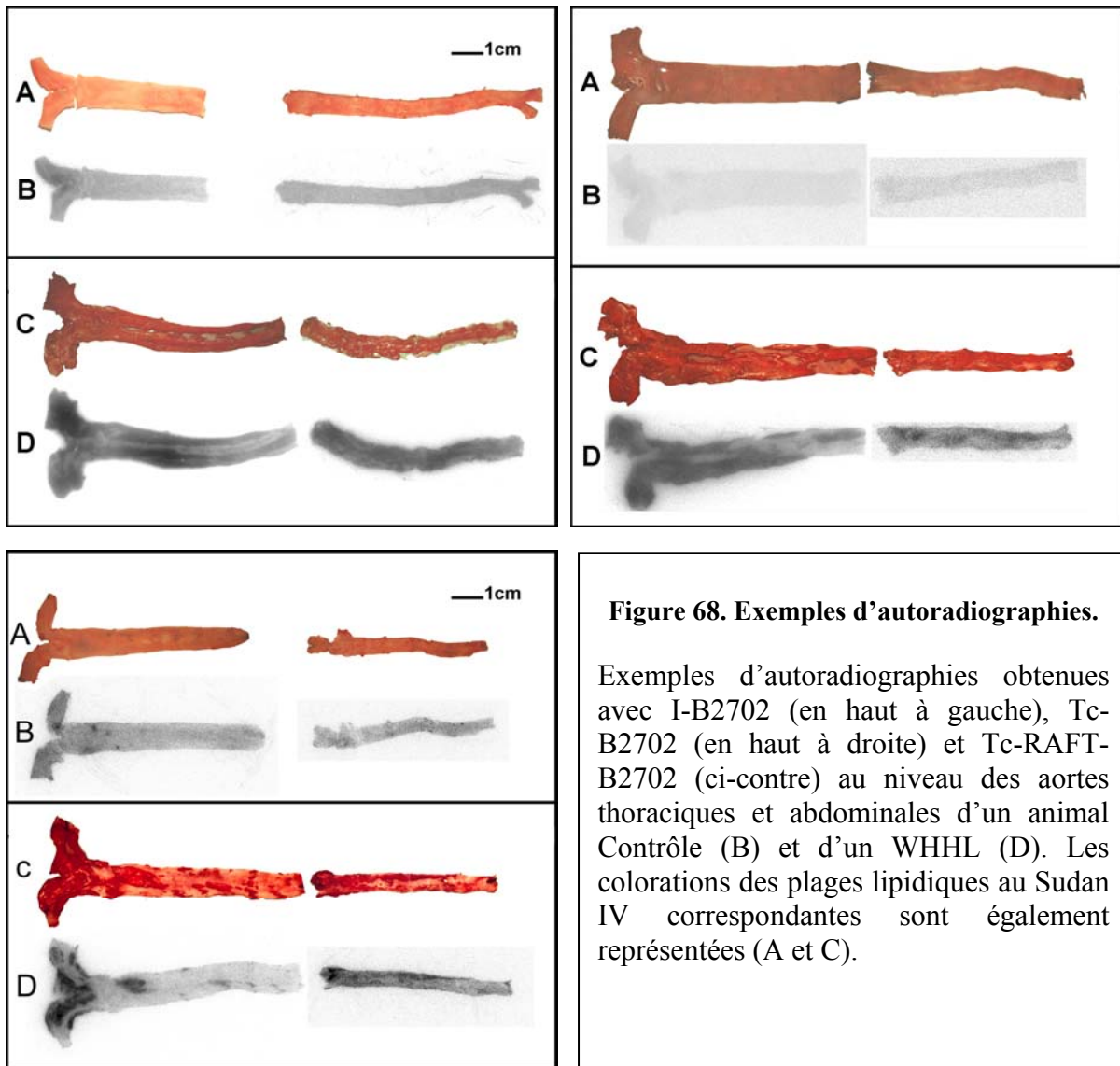


Figure 67. Exemple d'images en vue latérale obtenues en imagerie planaire.

Sur cet exemple, les images sont réalisées avec Tc-B2702. En A, numérotées de 1 à 15 sont représentées les 30 premières secondes d'acquisition. Chaque image représente 2 secondes d'acquisition de la radioactivité. On peut suivre le premier passage du radiotraceur dans l'organisme depuis son injection dans la veine de l'oreille (image 1), son passage cardiaque (image 6), aortique (image 9) jusqu'à sa diffusion dans l'organisme (image 15). Les images correspondant au passage aortique sont sommées afin de localiser cette structure avec précision (B). L'aorte n'est pas visible aux temps longs (en C, la sommation des 30 dernières minutes d'acquisition).

3.5 Autoradiographie

Des exemples représentatifs d'autoradiographies (B et D), et les coloration au Sudan IV correspondantes (A et C) sont présentés sur la figure 68. Les aortes des lapins Contrôles ne présentent pas de coloration lipidique (A) et les fixations de I-B270, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702, visibles sur les images autoradiographiques correspondantes, sont faibles et homogènes (B). Des lésions athérosclérotiques Sudan IV-positives sont observées sur l'aorte des lapins WHHL (C). Il existe toujours une excellente corrélation entre les régions Sudan IV-positives et les localisations des radiotraceurs I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 déterminées par imagerie autoradiographique *ex vivo* (D).



3.6 Quantification

Les résultats des quantifications des images autoradiographiques sont présentés sur les figures 69 à 71. Les valeurs présentées, exprimées en PSL/mm², tiennent compte de la normalisation à la dose injectée. Les rapports de fixation entre les groupes WHHL et Contrôle sont représentés sur la figure 72.

Dans les régions Sudan IV-positives correspondant aux plaques d'athérome évoluées des aortes des lapins du groupe WHHL, la fixation de I-B2702 est de $2,33 \pm 1,23$ PSL/mm², celle de Tc-B2702 est de $0,25 \pm 0,08$ PSL/mm² et celle de Tc-RAFT-B2702 est de $0,30 \pm 0,06$ PSL/mm² (Figures 69, 70 et 71 respectivement). Ces valeurs sont 17 fois, 5,9 fois et 4,8 fois supérieures à celles obtenues dans les aortes du groupe Contrôle ($0,14 \pm 0,01$ PSL/mm², $0,04 \pm 0,01$ PSL/mm² et $0,06 \pm 0,01$ PSL/mm² respectivement, $P < 0,05$ pour les trois comparaisons) (Figure 72). De plus, les fixations de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 dans les régions Sudan IV-positives sont significativement supérieures à celle observées dans les régions Sudan IV-négatives avec des rapports d'activités de 4,0 pour I-B2702, 4,8 pour Tc-B2702 et 4,2 pour Tc-RAFT-B2702 ($P < 0,05$). Enfin, la fixation de I-B2702 est significativement plus élevée dans les régions Sudan IV-négatives des aortes du groupe WHHL que dans les aortes du groupe Contrôle ($P < 0,05$).

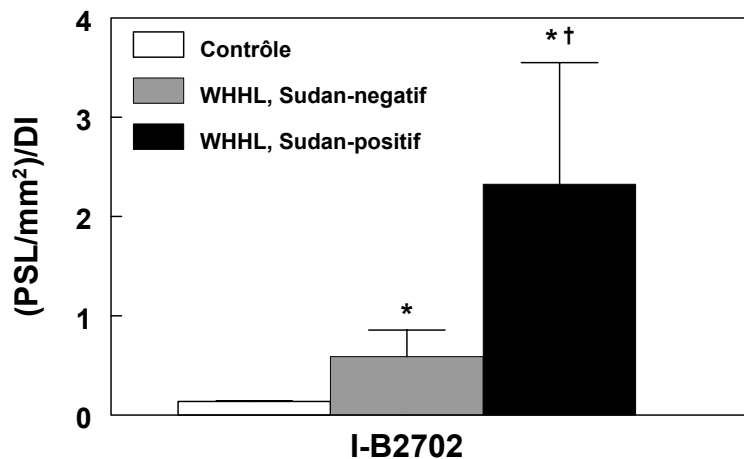


Figure 69. Fixation de I-B2702 à 180 min au niveau de l'aorte dorsale. $P < 0,05$ par rapport aux régions Contrôles (*) et Sudan IV-négatives (†).

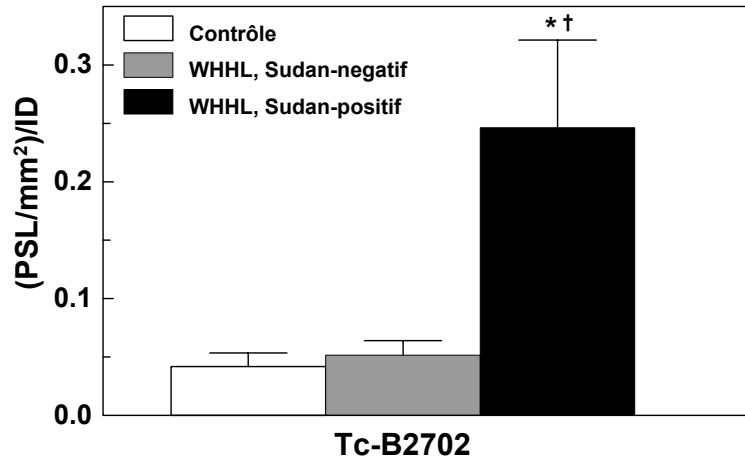


Figure 70. Fixation de Tc-B2702 à 180 min au niveau de l'aorte dorsale. $P < 0,05$ par rapport aux régions Contrôles (*) et Sudan IV-négatives (†).

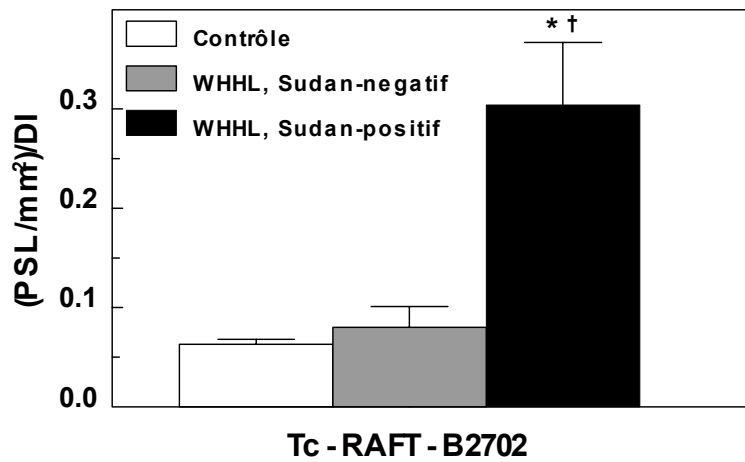


Figure 71. Fixation de Tc-RAFT-B2702 à 180 min au niveau de l'aorte dorsale. $P < 0,05$ par rapport aux régions Contrôles (*) et Sudan IV-négatives (†).

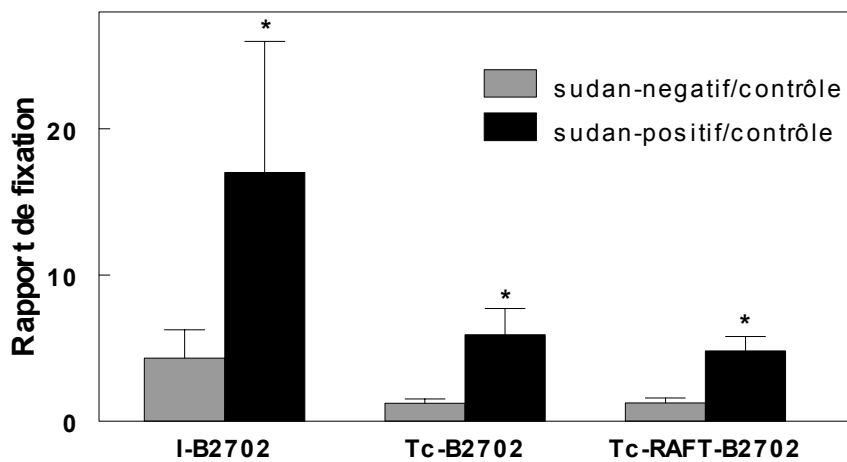


Figure 72. Rapports des fixations de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 à 180 min entre les groupes WHHL et Contrôle. * $P < 0,05$.

V. Discussion

A. Choix de la cible

L'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire chronique (Ross 1999). Les plaques sujettes à la rupture sont caractérisées par un processus inflammatoire exacerbé et par une fine capsule fibreuse recouvrant un large corps lipidique et nécrotique et sont définies comme des plaques vulnérables (Naghavi 2003). Au cours de ce processus inflammatoire, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice sont assurées par de nombreuses molécules d'adhésion qui entraînent le recrutement des monocytes et de cellules T dans la paroi artérielle (Chia 1998, Huo 2001). Parmi ces molécules d'adhésion, VCAM-1 joue un rôle majeur dans l'initiation et le développement des lésions athérosclérotiques (Ley 2001, Cybulsky 2001). Cette protéine de 110 kda fait partie de la famille des immunoglobulines. Elle est exprimée par les cellules endothéliales activées et lie VLA-4, qui est exprimée constitutivement sur les lymphocytes et les monocytes (Osborn 1989). Cybulsky et al. (2001) ont créé des souris homozygotes possédant une VCAM-1 incomplète par délétion de son domaine 4 (VCAM-1^{D4D/D4D}). Après croisement avec des souris hypercholestérolémiques LDLR^{-/-} qui constituent un modèle de choix pour l'athérosclérose, l'aire occupée par des lésions athérosclérotiques était réduite de 40% dans les aortes des souris VCAM-1^{D4D/D4D} LDLR^{-/-}. Les auteurs en concluent donc que VCAM-1 joue un rôle majeur dans l'athérogénèse (Ley 2001). L'expression de VCAM-1 est restreinte aux plaques, incluant les lésions de stade précoce, chez le lapin, la souris et l'homme (Iiyama 1999, O'Brien 1993, O'Brien 1996, Cybulsky 1991). De plus, comme O'Brien et al. l'ont montré chez l'homme (O'Brien 1993, O'Brien 1996), l'expression de VCAM-1 est fortement corrélée à l'accumulation des macrophages et des lymphocytes dans la plaque, critère majeur dans la définition des plaques vulnérables (Naghavi 2003). VCAM-1 est donc une cible potentielle pour l'imagerie moléculaire non-invasive de la plaque d'athérome vulnérable.

B. Choix du ligand

Dans la présente étude, les ligands de VCAM-1, B2702 et B2702(R), sont radiomarqués et leur capacité à marquer les plaques d'athérome est évaluée sur un modèle de lapin hyperlipidémique. B2702 et B2702(R) appartiennent à une série de peptides issus de la

séquence linéaire de la molécule de CMH-I possédant d'importants effets immunomodulateurs *in vitro* et *in vivo* chez des modèles animaux et humains. Un de ces peptides, correspondant à l'hélice $\alpha 1$ d'une molécule de CMH-I, s'est avéré capable de bloquer la cytotoxicité à médiation cellulaire. Les effets immunomodulateurs observés sont entièrement dus aux 10 derniers acides aminés carboxy-terminaux 75-84 (B2702), et la séquence répétée 75-84/84-75 [B2702(R)] s'est avérée être la plus efficace (Nossner 1996). *In vitro*, la liaison spécifique de B2702-R à VCAM-1 a été mise en évidence par la technique du double hybride ainsi que par western blot. *In vivo*, sur un modèle d'inflammation pulmonaire induite chez la souris par l'ovalbumine, le recrutement des leucocytes circulants au niveau des alvéoles pulmonaires est bloqué par l'administration de B2702(R) ou d'un anti-corps anti-VLA-4. Ces résultats indiquent que la séquence peptidique 75-84 est un puissant antagoniste de la liaison VCAM-1/VLA-4 (Ling 2000).

C. Etude *in vitro* de l'interaction cible-ligand

Les résultats obtenus en polarisation de fluorescence ont permis de mettre en évidence la liaison de B2702, couplé à un fluorochrome, à VCAM-1. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser les affinités relatives entre les différents ligands évalués dans cette étude, néanmoins les résultats obtenus permettent de valider le choix du motif peptique B2702 pour la mise au point d'un radiotraceur de VCAM-1 (Chap III).

D. Choix du modèle pour les études *in vivo*

Les expériences présentées dans ce travail sont réalisées sur des lapins « Watanabe Heritable Hyperlipidemic » (WHHL), un modèle animal d'hypercholestérolémie familiale (Kondo 1975, Buja 1990). Les WHHL développent spontanément des plaques d'athérome. Chez les animaux adultes, les plaques sont caractérisées par des phénomènes inflammatoires importants incluant le recrutement de nombreux leucocytes et monocytes, ainsi que la formation de cellules spumeuses (Clubb 2001, Fruebis 1997). Les caractéristiques de ce modèle ont été présentées en détail plus haut (Chap IV.A.1)

E. Validation du modèle

Les dosages plasmatiques confirment l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie des animaux du groupe WHHL. En effet, le taux de cholestérol est multiplié par 16 et celui des triglycérides par 8 comparativement au groupe Contrôle. L'hypercholestérolémie résulte principalement de l'accumulation des LDL dans le sang. Néanmoins, il a également été mis en évidence sur ce modèle animal des augmentations des taux de VLDL et IDL circulantes qui contribuent à ce phénomène d'hypercholestérolémie. L'hypertriglycéridémie résulte de cette augmentation des taux de VLDL et IDL circulantes, mais également de celui des LDL dont elles représentent 20 % de la masse. (Havel 1989).

La coloration au Sudan IV révèle la présence de nombreuses plaques d'athérome aortiques chez les animaux du groupe WHHL et l'absence de ces plaques chez les animaux du groupe Contrôle. Cette athérogénèse étant la conséquence directe de l'élévation du taux de cholestérol plasmatique, elle n'apparaît donc que dans le groupe d'animaux hypercholestérolémiques. Les plaques se forment préférentiellement aux niveaux des bifurcations artérielles. Ceci s'explique par le fait qu'au niveau de ces sites il existe une dysfonction endothéliale qui prédispose ces régions à l'athérogénèse (Revue bibliographique Chap III.B.1, Malek 1999).

L'expression de VCAM-1 est évaluée par immunohistochimie chez les lapins WHHL et Contrôles.

- Groupe Contrôle

Les résultats indiquent que VCAM-1 n'est pas exprimée au niveau des aortes thoraciques et abdominales des animaux normo-lipidémiques du groupe Contrôle. Cette absence d'expression de VCAM-1 dans les régions saines est en accord avec les résultats d'études précédemment réalisées sur ce même modèle animal (Cybulsky 1991).

- Groupe WHHL

o Régions Sudan IV-négatives

VCAM-1 est exprimée par les cellules endothéliales des régions Sudan IV-négatives. Ces régions correspondent probablement à des stades précoces de l'athérogénèse (I et II d'après la classification de Stary). A ces stades, il n'y a pas encore d'accumulation extra-cellulaire de

lipide visible à l'œil nu après une coloration au Sudan IV, ni aucun remodelage de la paroi artérielle, en revanche la présence de VCAM-1 lors de ces stades précoces de l'athérogénèse a été documentée (Iiyama 1999).

○ Régions Sudan IV-positives

La présence de VCAM-1 est observée au niveau de l'endothélium, ainsi que dans les couches profondes de l'intima, au niveau des cellules spumeuses et dans le corps nécrotique des lésions athérosclérotiques de stades avancés. Cette répartition de l'expression de VCAM-1 est en accord avec des résultats publiés précédemment par Fruebis et al. (1997) et Iiyama et al. (1999), sur un modèle expérimental similaire. Ces auteurs montrent que VCAM-1 est localisée au niveau de l'endothélium des lésions athérosclérotiques, mais également au sein de la lésion. Les cellules musculaires lisses proliférantes sont les principales responsables de cette expression intra-plaque, mais VCAM-1 est également exprimée par l'endothélium de la néovasculature et par les macrophages. Cette localisation intra-plaque de VCAM-1 a également été observée chez l'homme (O'Brien 1993, O'Brien 1996). Enfin, l'expression importante de VCAM-1 est également à rapprocher de la forte infiltration monocytaire et de la forte concentration en macrophages observée dans les plaques athérosclérotiques des aortes de lapins WHHL par Shiomi et al. (1994).

F. Evaluation de $^{125}\text{I-B2702(R)}$ et $^{125}\text{I-B2702}$

Les études de biodistribution indiquent que I-B2702(R), 30 minutes après son injection, est principalement localisé dans les poumons des animaux WHHL et Contrôles. Ainsi, l'activité pulmonaire de I-B2702(R) est 21 fois plus élevée que celle de B2702. Cette captation pulmonaire très élevée est probablement responsable de la faible activité circulante de I-B2702(R), qui est 3 fois plus faible que celle de I-B2702. Elle est probablement due aux propriétés lipophiles de ce peptide dimérique. Les études de biodistribution montrent également qu'en accord avec la lipophilie du traceur, I-B2702(R) est principalement excrété par le système hépatobiliaire alors que I-B2702, plus hydrophile, est majoritairement éliminé par les reins.

L'autoradiographie indique que I-B2702(R) et I-B2702 s'accumulent tous deux au niveau des plaques d'athérome Sudan IV-positives. Néanmoins, la fixation non spécifique de I-B2702(R) au niveau des aortes du groupe Contrôle est plus élevée que celle de I-B2702, probablement

toujours du fait de sa lipophilie. En conséquence, le rapport de fixation de B2702(R) entre les régions Sudan IV-négatives et Contrôles est 5 fois plus faible que celui obtenu avec I-B2702. De même, le rapport de fixation de B2702(R) entre les régions Sudan IV-positives et Contrôles est 6 fois plus faible que celui obtenu avec I-B2702.

En raison de l'importante radioactivité pulmonaire de I-B2702(R) et de son faible rapport de fixation entre les plaques d'athérome des animaux WHHL et les régions saines des animaux Contrôles (3,6 versus 21,6 avec I-B2702), ce motif peptidique a été écarté de la suite de l'étude. La fixation pulmonaire constitue à elle seule un obstacle rédhibitoire puisqu'elle ne permet pas d'envisager la réalisation d'imagerie cardiaque non invasive. B2702 a donc été retenu pour la suite des études.

G. Evaluation de ^{123}I -B2702, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702, et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-B2702

B2702 a été évalué après radiomarquage à l'iode 123 ou au technétium 99m comme radiotraceur de VCAM-1 au sein de la plaque d'athérome. Le radiomarquage au technétium 99m a été effectué sur le motif peptidique linéaire modifié (Tc-B2702) ou sur un complexe protéique sur lequel sont greffés 4 motifs linéaires modifiés dans le but d'améliorer l'affinité du ligand pour VCAM (Tc-RAFT-B2702).

Les résultats des cinétiques sanguines indiquent qu'à la première composante exponentielle rapide préalablement observée lors du protocole 1 durant les 30 premières minutes, succède une seconde composante également exponentielle mais plus lente ($T_{1/2} \sim 600$ minutes pour I-B2702, ~ 120 minutes pour Tc-B2702 et ~ 100 minutes pour Tc-RAFT-B2702).

Les résultats de la biodistribution indiquent qu'en moyenne, dans le groupe WHHL, l'activité sanguine de I-B2702 est divisée par 1,9 entre 30 et 180 minutes. L'activité aortique, dans ce même groupe est divisée par 1,7. L'amélioration du rapport d'activité entre l'aorte et le sang est donc relativement faible. Néanmoins, le prélèvement aortique obtenu lors de la biodistribution est réalisé dans la région thoracique distale, la région de l'aorte thoracique possédant la plus faible concentration en plaques d'athérome. Or le prélèvement, un anneau de 5 mm de hauteur environ réalisé avant l'ouverture longitudinale de l'artère, est représentatif de l'ensemble de la paroi artérielle. Il est constitué à la fois de régions Sudan IV-positives et de régions Sudan IV-négatives. Le rapport aorte sur sang ne peut en conséquence

pas être assimilé à un rapport cible sur sang puisqu'il le sous-estime. Néanmoins, ce rapport artère sur sang est significativement plus élevé dans le groupe WHHL que dans le groupe Contrôle, aussi bien pour I-B2702 que pour Tc-B2702. Enfin, une augmentation significative de la captation de Tc-RAFT-B2702 au niveau du tissu graisseux des animaux du groupe WHHL a été observée. Cette élévation n'est pas observée avec les 2 autres traceurs. La structure peptidique RAFT, absente des deux autres traceurs, pourrait donc être à l'origine de cette fixation qui demeure toutefois inexplicée.

Les résultats de l'imagerie autoradiographique *ex vivo* indiquent que I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 s'accumulent au niveau des lésions athérosclérotiques aortiques du groupe WHHL, mises en évidence par la coloration au Sudan IV. L'activité en traceurs dans les régions Sudan IV-positives est significativement supérieure à celle observée au niveau des aortes du groupe Contrôle ($X 17 \pm 9$ pour I-B2702, $X 5,9 \pm 1,8$ pour Tc-B2702 et $4,8 \pm 1,0$ pour Tc-RAFT-B2702) mais également à celle observée dans les régions adjacentes Sudan IV-négatives des même animaux. De plus, une augmentation progressive de l'activité de I-B2702 est observée, des aortes Contrôles aux régions Sudan IV-négatives et Sudan IV-positives des aortes du groupe WHHL. Ces trois niveaux d'accumulation sont en accord avec les trois niveaux d'expression de VCAM-1 observés en immunohistochimie.

In vivo, la fixation aortique des radiotraceurs n'a pas pu être mise en évidence à 180 minutes par détection externe de la radioactivité à l'aide de la gamma-caméra. Cela signifie que le rapport de détection de l'activité émanant de la cible sur l'activité émanant du bruit de fond est insuffisant. Cela peut être dû :

- A l'activité circulante.

En effet, 180 minutes après l'injection des traceurs, les activités circulantes de I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 représentent encore $32,9 \pm 3,5$ %, $12,8 \pm 1,8$ % et $56,3 \pm 3,2$ % de l'activité initiale à 1 min. L'activité sanguine la plus élevée est observée avec le Tc-RAFT-B2702 ; sur les scintigraphies réalisées *in vivo* avec ce traceur elle masque probablement la fixation spécifique du radioligand au niveau des lésions athérosclérotiques. L'activité circulante de I-B2702 et Tc-B2702 est 2,3 fois et 3,7 fois plus faible à 180 minutes que celle de Tc-RAFT-B2702.

L'imagerie pourrait être réalisée à un temps plus tardif afin d'améliorer l'élimination sanguine des radiotraceurs. La seconde exponentielle de la cinétique sanguine de Tc-B2702 étant 5 fois plus rapide que celle de I-B2702, le gain résultant d'un allongement du délai entre l'injection

et l'imagerie serait probablement plus important pour cette molécule. Dans ce cadre, la période de 6 heures du ^{99m}Tc est toutefois une limitation.

- Au faible volume de la cible.

En effet, les activités hépatiques et rénales masquant l'aorte thoracique, l'observation est réalisée au niveau de l'aorte abdominale caractérisée par une densité en plaques d'athérome moins importante. L'utilisation d'animaux plus âgés présentant une densité de plaques aortiques abdominales plus élevée est envisagée.

- A une spécificité pour la cible insuffisante.

D'après Ling et al., B2702(R) est fortement spécifique de VCAM-1 puisqu'il entre en compétition avec VLA-4, son ligand naturel et inhibe *in vivo* la fixation de celui-ci avec la même efficacité qu'un anticorps anti-VLA-4. Néanmoins, cette spécificité a pu être diminuée par le radiomarquage à l'iode ou au technétium qui modifie, même légèrement, la chimie de la molécule. Dans le but d'étudier le degré d'interaction entre nos différents ligands et VCAM-1 et l'influence du radiomarquage, la technique de polarisation de fluorescence est actuellement développée au laboratoire (Chap III).

Parmi les 3 traceurs évalués sur 180 minutes, I-B2702 présente le meilleur rapport de fixation entre les régions comportant des lésions athérosclérotiques et les régions saines. Le traceur Tc-B2702 présente lui la meilleure cinétique d'élimination sanguine. Ces deux traceurs sont donc les plus prometteurs pour les études ultérieures. En revanche, le traceur Tc-RAFT-B2702 présente la plus forte fixation pulmonaire, le plus faible rapport de fixation entre les régions comportant des lésions athérosclérotiques et les régions saines, et la moins bonne cinétique d'élimination sanguine. Cette cinétique lente peut être due au poids moléculaire élevé de ce traceur.

H. Comparaison avec les autres radiotraceurs proposés

De nombreux radiotraceurs émetteurs de photons gamma ont été ou sont actuellement évalués. Ils ont pour cibles les LDL natives ou oxydées, les cellules musculaires lisses proliférantes, les macrophages, les cellules apoptotiques, les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire ou encore le thrombus (Vallabhajosula 1997, Mitchel 2000, Tsimikas 2002, Petrov 2003, Johnson 2003, Ohtsuki 2001, Kolodgie 2003, Schafers 2004). L'accumulation du ^{18}F -FDG au sein des macrophages recrutés dans la plaque a également été proposée pour

l'imagerie *in vivo* en tomographie par émission de positons (Ogawa 2004). Le ^{18}F -FDG a permis la visualisation des plaques localisées sur l'aorte abdominale de lapins WHHL, mais en raison de la forte captation myocardique de ce radiotraceur, les auteurs indiquent que l'imagerie des lésions coronaires nécessitera sans doute le recours à une sonde intravasculaire sensible aux positons.

Parmi les radiotraceurs mentionnés ci-dessus, le "macrophage chemoattractant protein-1" (MCP-1) radiomarké à l'iode 125 (Ohtsuki 2001) ou au technétium 99m (Petrov 2003), et l'annexine marquée au technétium 99m constituent les deux meilleurs candidats pour l'imagerie nucléaire de la plaque d'athérome vulnérable.

1. MCP-1 et Annexine V

- MCP-1 est un ligand du récepteur CCR2 exprimés par les monocytes et les macrophages recrutés dans la plaque. Sur un modèle d'athérosclérose induite chez le lapin par déendothélialisation d'une artère iliaque associée à un régime hyperlipidémique, l'accumulation de ce radiotraceur au niveau des plaques d'athérome a été mise en évidence par autoradiographie (Ohtsuki 2001). Le rapport de fixation entre les lésions athérosclérotiques de l'iliaque déendothélialisée et l'iliaque saine est de 6. Dans une seconde étude réalisée *in vivo*, les lésions athérosclérotiques sont visibles 180 minutes après l'injection du radiotraceur marqué au technétium 99m (Petrov 2003).

- Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -annexine V est un radiotraceur de l'apoptose (Strauss 2000, Kolodgie 2003, Johnson 2003, Kietselaer 2004). Le rapport de fixation de ce radiotraceur entre les zones de plaques et les vaisseaux normaux, déterminé *ex vivo* en autoradiographie et de 15 ± 7 (Kolodgie 2003). *In vivo*, ce radiotraceur a permis la détection de 3 artères athérosclérotiques sur 4 (Johnson 2003).

2. La place de B2702

Dans la présente étude, le rapport de fixation de B2702 entre les régions athérosclérotiques Sudan IV-positives et les aortes des animaux du groupe Contrôle quantifié *ex vivo* par autoradiographie 3 heures après l'injection est de 17 ± 9 pour I-B2702, $5,9 \pm 1,8$ pour Tc-B2702 et $4,8 \pm 1,3$ pour Tc-RAFT-B2702. Ces rapports sont donc comparables voire

légèrement supérieurs à ceux obtenus par Kolodgie et al. et Ohtsuki et al. avec l'annexine V radiomarquée au Technetium 99m et avec le ^{125}I -MCP-1 sur un modèle expérimental de lapin au même temps après l'injection (15 ± 7 pour l'annexine V, et 6 pour MCP-1).

I. Conclusions et perspectives

Les études autoradiographiques indiquent que B2702, marqué à l'iode 123 ou au technétium 99m, ainsi que Tc-RAFT-B2702 s'accumulent dans les plaques d'athérome exprimant VCAM-1. I-B2702, Tc-B2702 et Tc-RAFT-B2702 constituent donc de nouveaux radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable. Si les premières études d'imagerie nucléaire n'ont pas permis de réaliser la détection non invasive des plaques d'athérome vulnérables à l'aide de ces trois traceurs, les résultats observés *ex vivo* nous encouragent toutefois à poursuivre l'évaluation de ces traceurs. Le principal obstacle rencontré est une activité circulante élevée des traceurs résultant en un faible rapport entre la fixation spécifique des traceurs aux plaques d'athérome et l'activité sanguine. Des modifications chimiques sont donc envisagées afin de modifier leurs cinétiques d'élimination sans toutefois altérer leur affinité pour VCAM-1. Tous les résultats expérimentaux observés avec nos traceurs seront également comparés avec ceux obtenus avec des traceurs tels que le ^{18}F -FDG et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 dans nos conditions expérimentales.

De plus, un brevet concernant l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable avec des ligands radioactifs de VCAM-1 a été déposé auprès de l'INSERM sur la base des résultats présentés dans cette étude.

Les perspectives incluent également l'exploration de nouvelles cibles. Ainsi, Moreno et al. (2004) ont mis en évidence le rôle majeur de la néoangiogénèse dans la déstabilisation et la rupture des plaques d'athérome. Nous disposons au laboratoire d'un ligand radioactif d'alpha-V beta-3, une intégrine impliquée dans la migration des cellules endothéliales et spécifique des néovaisseaux qui sera prochainement évalué sur le modèle expérimental du lapin WHHL. Enfin, une troisième cible est envisagée qui ne peut être dévoilée ici pour des raisons de confidentialité. Des ligands radioactifs de cette cible seront prochainement synthétisés par l'équipe du Pr. Dumy et évalués au laboratoire.

Références Bibliographiques

Arbab AS, Koizumi K, Toyama K, Arai T, Araki T. Technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium 201 uptake in rat myocardial cells. *J Nucl Med* **1998**; 39 : 266 - 271

Achenbach S, Moselewski F, Ropers, Ferencik M, Hoffmann U, MacNeill B, Pohle K, Baum U, Anders K, Jang IK, Daniel WG, Brady TJ. Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography. A segment-based comparison with intravascular ultrasound. *Circulation* **2004**; 109 : 14-17

Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation* **1989**; 80 : 1846 – 1861

Anand SS, Razak F, Yi Q, Davis B, Jacobs R, Vuksan V, Lonn E, Teo K, McQueen M, Yusuf S. C-reactive protein as a screening test for cardiovascular risk in a multiethnic population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**; 24 : 1509-1515

Anastassopoulou N, Arapoglou B, Demakakos P, Makropoulou MI, Paphiti A, Serafetinides AA. spectrometric characterisation of carotid atherosclerotic plaque by laser induced fluorescence. *Lasers Surg Med* **2001**; 28 : 67-73

Aoyama T, Fujiwara H, Masaki T, Sawamura T. Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **1999** ; 31 : 2101 – 2114

Arheden H, Saeed M, Higgins CB, Gao DW, Bremerich J, Wytenbach R, Dae MW, Wendland MF. Measurement of the distribution volume of gadopentate dimeglumine at echo-planar MR imaging to quantify myocardial infarction: comparison with ^{99m}Tc-DTPA autoradiography in rats. *Radiolog.* **1999**; 211 : 698 - 708

Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* **1988**; 8 : 79-87

Barger AC, Beuwkes R 3rd. Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **1990**; 66 : 41G - 43G

Beanlands R, Muzik O, Nguyen N, Petry N, Schwaiger M. The relationship between myocardial retention of technetium-99m teboroxime and myocardial blood flow. *J Am Coll cardiol* **1992**; 20 : 712 – 719

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **2002**; 287 : 2570 – 81

Bellamy RF. Diastolic coronary artery pressure-flow relations in the dog. *Circ Res* **1978**; 43 : 92-101

Beller GA, Watson DD, Ackell P, Pohost GM. Time course of thallium-201 redistribution after transient myocardial ischemia. *Circulation* **1980**; 61 : 791 – 797

- Beller** GA, Glover DK, Edwards NC, Ruiz M, Simanis JP, Watson DD. ^{99m}Tc-sestamibi uptake and retention during myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* **1993**; 87 : 2033 – 2042
- Beller** GA, Bergmann SR. Major achievement in nuclear cardiology: II. Myocardial perfusion imaging agents: SPECT and PET. *J Nucl Cardiol* **2004**; 11 : 71 – 86
- Bergmann** SR, Herrero P, Markham J, Weinheimer CJ, Walsh MN. Noninvasive quantification of myocardial blood flow in human subjects with oxygen-15-labeled water and positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* **1989**; 14 : 639 – 652
- Bergmann** SR. Cardiac positron emission tomography. *Semin Nucl Med* **1998**; 28 : 320-340
- Bernard** BF, Krenning EP, Breeman WAP, Ensing G, Benjamins H, Bakker WH, Visser TJ, de Jong M. ^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-tetrofosmin and ^{99m}Tc-Q12 in vitro and in vivo. *Nucl Med Biol* **1998**; 25 : 233 – 240
- Bogen** S et al. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* **1994**; 179 : 1059 – 1064
- Boyle** MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation*. 1993; 88 : 2872 – 2883
- Bremer** C, Tung CH, Weissleder R. In vivo molecular assessment of matrix metalloproteinases inhibition. *Nature medicine* **2001**; 7 : 743-748
- Brezinski** M. Characterizing arterial plaque with optical coherence tomography. *Curr Op Cardiol* **2002**; 17 : 648-655
- Brismar** T. In vivo analysis of intracellular thallium-201 accumulation in skeletal muscle of the rat. *Acta Physiol Scand* **1991**; 142 : 475-480
- Brown** MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: genetic biochemical and pathophysiologic considerations. *Adv Intern Med* **1975**; 20 : 273 – 296
- Brown** KA. Prognostic value of thallium-201 myocardial perfusion imaging - a diagnostic tool comes of age. *Circulation* **1991**; 83 : 363 – 376
- Brown** KA, Rowen M. Prognostic value of a normal exercise myocardial perfusion imaging study in patients with angiographically significant coronary artery disease. *Am J Cardiol* **1993**; 71 : 865 – 867
- Bryant** M. Texas A&M University. Department of Biochemistry and Biophysics. Review of lipoproteins. March 21, 2003.
<http://www.tamu.edu/classes/bich/bmiles/lectures/Lipid%20Transport.pdf>

Buja ML, Clubb FJ, Bilheimer DW, Willerson JT. Pathobiology of human familial hypercholesterolaemia and related animal model, the watanabe heritable hyperlipidaemic rabbit. *Eur Heart J* **1990**; 11(Suppl E) : 41 – 52

Caldwell JH, Mertens H, Linssen M, van der Vusse GJ, Buell U, Kammermeier H. Uptake kinetics of technetium-99m-methoxyisobutylisonitrile and thallium-201 in adult rat heart endothelial and fibroblast-like cells in comparison to myocytes. *J Nucl Med* **1992**; 33 : 102 – 107

Calnon DA, Glover DK, Beller GA, Vanzetto G, Smith WH, Watson DD, Ruiz M. Effects of dobutamine stress on myocardial blood flow, ^{99m}Tc Sestamibi uptake, and systolic wall thickening in the presence of coronary artery stenoses - implications for dobutamine stress testing. *Circulation* **1997**; 96 : 2353 – 2360

Calnon DA, Ruiz M, Vanzetto G, Watson DD, Beller GA, Glover DK. Myocardial uptake of Tc-99m sestamibi during dobutamine stress is enhanced by ruthenium red, an inhibitor of mitochondrial calcium influx. *Circulation* **1997**⁽²⁾; 96 : I-687 (Abstract)

Calnon DA, Ruiz M, Vanzetto G, Watson DD, Beller GA, Glover DK. Myocardial uptake of ^{99m}Tc-N-NOET and ²⁰¹Tl during dobutamine infusion. Comparison with adenosine stress. *Circulation* **1999**; 100 : 1653 – 1659

Canby RC, Silber S, Pohost GM. Relations of the myocardial imaging agents ^{99m}Tc-MIBI and ²⁰¹Tl to myocardial blood flow in a canine model of myocardial ischemic insult. *Circulation* **1990**; 81 : 289 – 296

Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* **2004**;109(suppl III) : III-2 – III-7

Carrio I, Pieri PL, Narula J, Prat L, Riva P, Pedrini L, Petrolani E, Caruzo G, Sarti G, Estorch M, Berna L, Riambau V, Matias-Guiu X, Pak C, Ditlow C, Chen F, Khaw BA. Noninvasive localisation of human atherosclerotic lesions with indium 111-labeled monoclonal Z2D3 antibody specific for proliferating smooth muscle cells. *J Nucl Cardiol* **1998**; 5 : 551 – 557

Carvalho PA, Chiu ML, Kronauge JF, Kawamura M, Jones AG, Holman BL, Piwnicka-Worms D. Subcellular distribution and analysis of technetium-99m-MIBI in isolated perfused rat hearts. *J Nucl Med* **1992**; 33 : 1516 – 1521

Checovich WJ, Bolger R, Burke T. Fluorescence polarisation – a new tool for cell and molecular biology. *Nature* **1995**; 375 : 254 – 256

Chen J, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, Huang PL, Weissleder R. *In vivo* imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* **2002**; 105 : 2766 – 2771

Chernoff DM, Strichartz GR, Piwnicka-Worms D. Membrane potential determination in large unilamellar vesicles with hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I). *Biochim biophys Acta* **1993**; 1147 : 262 - 266

Chia MC. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Clin Rev in Clin Lab Sci.* **1998**; 35(6): 573 - 602

Chien S. Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall. *Prog Biophys Mol Biol* **2003** 83 : 131 – 151

Chinetti G, Fruchart JC, staels B. Peroxisome proliferators-activators: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Op Lipidiol* **2003**; 14 : 459 – 468

Chiong JR, Miller AB. Agents that stabilise atherosclerotic plaque. *Expert Opin Investig Drugs* **2003**; 12 : 1681 – 1692

Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica-Worms D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I) in cultured mouse fibroblasts. *J Nucl Med* **1990**; 31 : 1646 – 1653

Christian TF, Miller TD, Bailey KR, Gibbons RJ Noninvasive identification of severe coronary artery disease using exercise tomographic thallium-201 imaging. *Am J Cardiol* **1992**; 70 : 14 – 20

Chu A, Murdock RH, Cobb FR. Relation between regional distribution of thallium-201 and myocardial blood flow in normal, acutely ischemic, and infarcted myocardium. *Am J Cardiol* **1982**; 50 : 1141 – 1144

Clubb FJ, Cerny JL, Defarrari DA, Butler-Aucoin MM, Willerson JT, Buja M. Development of atherosclerotic plaque with endothelial disruption in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aorta. *Cardiovasc Pathol* **2001**; 9: 1 - 11

Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* **2003**; 24 : 987 – 1003

Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leucocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **1991**; 251: 788 – 791

Cybulsky MI, Liyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Liyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1 but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* **2001**; 107: 1255 – 1262

Dahlberg ST, Gilmore MP, Leppo JA. Interaction of technetium 99m-labeled teboroxime with red blood cells reduces the compound's extraction and increases apparent cardiac washout. *J Nucl Cardiol* **1994**; 1 : 270 – 279

Dayanikli F, Grambow D, Muzik O, Mosca L, Rubenfire M, Schwaiger M. Early detection of abnormal flow reserve in asymptomatic men at high risk for coronary artery disease using positron emission tomography. *Circulation* **1994**; 90 : 808 – 817

De Franco AC, Nissen SE. Coronary intravascular ultrasound : implication for understanding the development and potential regression of atherosclerosis. *Am J Cardiol* **2001**; 88(suppl) : 7M - 20M

De Korte CL, Siervogel MJ, Mastik F, Strijder C, Schaar JA, Velema E, Pasterkamp G, Serruys PW, Van der Steen AF. Identification of atherosclerotic plaque components with intravascular ultrasound elastography *in vivo* : a Yucatan pig study. *Circulation* **2002**; 105 : 1627 – 1630

DeCoster PM, Wijns W, Cauwe F, Robert A, Beckers C, Melin JA. Area-at-risk determination by technetium-99m-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile in experimental reperfused myocardial infarction. *Circulation* **1990**; 82 : 2152 – 2162

Demacker PNM, Dormans TPJ, Koenders EB, Corstens FHM. Evaluation of Indium-111-polyclonal immunoglobulin G to quantitate atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits with scintigraphy: effect of age and treatment with antioxidants or ethinylestradiol. *J Nucl Med* **1993**; 34 : 1316 – 1321

Demaimay F, Noiret N, Roucoux A, Patin H, Bellande E, Pasqualini R, Moisan A. New bis(dithiocarboxylato) nitridotechnetium-99m radiopharmaceuticals for leukocyte labelling: in vitro and in vivo studies. *Nucl Med Biol* **1997**; 24 : 439 – 445

Demaimay F, Dazord L, Roucoux A, Noiret N, Patin H, Moisan A. Rhenium-188 and technetium-99m nitridobis (N-ethoxy-N-ethylthiocarbamate) leucocyte labelling radiopharmaceuticals: [$^{188}\text{ReN}(\text{NOET})_2$] and [$^{99\text{m}}\text{TcN}(\text{NOET})_2$], NOET = Et(EtO)NCS₂: their in vitro localization and chemical behaviour. *Nucl Med Biol* **1997**⁽²⁾; 24 : 701 – 705

Di Rocco RJ, Rumsey WL, Kuczynski BL, Linder KE, Pirro JP, Narra RK, Nunn AD. Measurement of myocardial blood flow using a co-injection technique for technetium-99m-teboroxime, technetium-96-sestamibi and thallium-201. *J Nucl Med* **1992**; 33 : 1152 – 1159

Dinkelborg LM, Duda SH, Hanke H, Tepe G, Hilger CS, Semmler W. Molecular imaging of atherosclerosis using a technetium-99m endothelin derivative. *J Nucl Med* **1998**; 39 : 1819 – 1822

Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* **2000**; 101 : 2290 - 2295

Drouet L. Thrombosis and its therapeutic targets. *Rev Prat* **1999**; 49 : 1617 – 1623

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leucocyte integrin VLA-4 at site distinct from VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **1990**; 60 : 577 – 584

Elmaleh DR, Narula J, Babich JW, Petrov A, Fischman AJ, Khaw BA, Rapaport E, Zamecnik PC. Rapid non invasive detection of experimental atherosclerotic lesions with novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled diadenosine tetraphosphates. *Proc Natl Acad Sci* **1998**; 95 : 691 – 695

- Fagret D**, Marie PY, Brunotte F, Giganti M, Le Guludec D, Bertrand A, Wolf JE, Piffanelli A, Chossat F, Bekhechi D. Myocardial perfusion imaging with technetium-99m-Tc-NOET: comparison with thallium-201 and coronary angiography. *J Nucl Med*. **1995**; 36 : 936 – 943
- Faia KL**, Davis WP, Marone AJ, Foxall TL. Matrix metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in situ zymography. *Atherosclerosis* **2002**; 160 : 325 – 337
- Farouc A**, Weissleder R. Seeing within. Molecular imaging of the cardiovascular system. *Circ Res* **2004**; 94 : 433 – 445
- Fayad ZA**, Fuster V, Fallon JT, Jayasundera T, Worthley SG, Helft G, Aguinaldo JG, Badimon JJ, Sharma SK. Noninvasive *in vivo* human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation* **2000**; 102 : 506-510
- Fischman AJ**, Rubin RH, Khaw BA, Kramer PB, Wilkinson R, Ahmad M, Needelman M, Locke E, Nossiff ND, Strauss HW. Radionuclide imaging of experimental atherosclerosis with nonspecific polyclonal immunoglobulin G. *J Nucl Med* **1989**; 30 : 1095 - 1100
- Flather MD**, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* **2000**; 355 : 1575 – 1581
- Forman R**, Kirk ES. Thallium-201 accumulation during reperfusion of ischemic myocardium: dependence on regional blood flow rather than viability. *Am J Cardio*. **1984**; 54 : 659 – 663
- Freeman I**, Grunwald AM, Hoory S, Bodenheimer MM. Effect of coronary occlusion and myocardial viability on myocardial activity of technetium-99m-sestamibi. *J Nucl Med* **1991**; 32 : 292 – 298
- Frederich A**. Le cholestérol-LDL chez les diabétiques. *Médecine thérapeutique endocrinologie* **2000** ; 2 : 235 – 240
- Friedman BJ**, Beihn R, Friedman JP. The effect of hypoxia on thallium kinetics in cultured chick myocardial cells. *J Nucl Med* **1987**; 28 : 1453 – 1460
- Fruchart JC**, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JJP, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*. **2004**; 109(suppl III) : III-15 - III-19
- Fruebis J**, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W. Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1997**; 17: 1289 – 1302
- Fukuyama T**, Nakamura M, Nakagaki O, Matsuguchi H, Mitsutake A, Kikuchi Y, Kuroiwa A. Reduced reflow and diminished uptake of ⁸⁶Rb after temporary coronary occlusion. *Am J Physiol* **1978**; 234 : H724 - H729

Fuster V. Lewis A. Conner Memorial lecture - mechanisms leading to myocardial infarction: insight from studies of vascular biology. *Circulation* **1994**;90 : 2126 – 2146

Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction : insights from studies of vascular biology. *Circulation*. **1995**; 90: 2126 – 2146

Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* **1999**; 353(suppl 2) : S115 – 119

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaque. *J Clin Invest* **1994**; 2493 – 2503

Geltman EM, Henes CG, Sennel MJ, Sobel BE, Bergmann SR. Increased myocardial perfusion at rest and diminished perfusion reserve in patients with angina and angiographically normal coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* **1990**; 16 : 586 – 595

Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin- I beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1996**; 16 : 19 - 27

Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1997**; 17 : 2200 – 2208

Gerry JL, Becker LC, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Evidence for a flow-independent contribution to the phenomenon of thallium redistribution. *Am J Cardiol* **1980**; 45 : 58 – 62

Ghezzi C, Fagret D, Arvieux CC, Mathieu JP, Bontron R, Pasqualini R, de Leiris J, Comet M. Myocardial kinetics of TcN-NOET: a neutral lipophilic complex tracer of regional myocardial blood flow. *J Nucl Med* **1995**; 36 : 1069 – 1077

Ghezzi C, Fagret D, Brichon PY, Mathieu JP, Bontron R, Pasqualini R, de Leiris J, Comet M : Redistribution of bis (N-Ethoxy, N)Ethyl Dithiocarbamate) Nitrido Technetium-99-m(V), a new myocardial perfusion imaging agent : comparison with Thallium 201 redistribution *Circulation* **1996**; 94 : I - 302 (Abstract)

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **1987**; 316 : 1371 – 1375

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis : the road ahead. *Cell* **2001**; 104 : 503 – 516

Glover DK, Okada RD. Myocardial kinetics of Tc-MIBI in canine myocardium after dipyridamole. *Circulation* **1990**; 81 : 628 – 636

Glover DK, Ruiz M, Edwards NC, Cunningham M, Simanis JP, Smith WH, Watson DD, Beller GA. Comparison between ²⁰¹Tl and ^{99m}Tc sestamibi uptake during adenosine-induced vasodilation as a function of coronary stenosis severity. *Circulation* **1995**; 91 : 813 – 820

Glover DK, Ruiz M, Bergmann EE, Simanis JP, Smith WH, Watson DD, Beller GA. Myocardial technetium-99m-teboroxime uptake during adenosine-induced hyperemia in dogs with either a critical or mild coronary stenosis: comparison to thallium-201 and regional blood flow. *J Nucl Med* **1995**⁽²⁾; 36 : 476 - 483

Glover DK, Ruiz M, Yang JY, Smith WH, Watson DD, Beller GA. Myocardial ^{99m}Tc-tetrofosmin uptake during adenosine-induced vasodilatation with either a critical or mild coronary stenosis: comparison with ²⁰¹Tl and regional myocardial blood flow. *Circulation* **1997**; 96 : 2332 – 2338

Glover DK, Ruiz M, Koplán BA, Watson DD, Beller GA. ^{99m}Tc-tetrofosmin assessment of myocardial perfusion and viability in canine models of coronary occlusion and reperfusion. *J Nucl Med* **1999**; 40 : 142 – 149

Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Review Biochem* **1977**; 46 : 897 – 930

Goldstein RA, Mullani NA, Marani SK, Fisher DJ, Gould KL, O'Brien HA Jr. Myocardial perfusion with rubidium-82. II. Effects of metabolic and pharmacologic interventions. *J Nucl Med* **1983**; 24 : 904 – 915

Goldstein RA, Mullani NA, Wong WH, Hartz RK, Hicks CH, Fuentes F, Smalling RW, Gould KL. Positron imaging of myocardial infarction with rubidium-82. *J Nucl Med* **1986** 27 : 1824 – 1829

Gould KL, Goldstein RA, Mullani NA, Kirkeeide RL, Wong WH, Tewson TJ, Berridge MS, Bolomey LA, Hartz RK, Smalling RW, et al.. Noninvasive assessment of coronary stenoses by myocardial perfusion imaging during pharmacologic coronary vasodilatation. VIII. Clinical feasibility of positron cardiac imaging without a cyclotron using generator-produced rubidium-82. *J Am Coll Cardiol* **1986**; 7 : 775 – 789

Gould LA , Rossouw JE, Santanello NC, Heyse JF, Furberg CD Cholesterol reduction yields clinical benefit : impact of statin trials. *Circulation* **1998**; 97 : 946 – 952

Gray WA, Gewirtz HG. Comparison of ^{99m}Tc-teboroxime with thallium for myocardial imaging in the presence of a coronary artery stenosis. *Circulation* **1991**; 84 : 1796 – 1807

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* **1997**; 96 : 3264 – 3265

Grunwald AM, Watson DD, Holzgrefe HH, Irving JF, Beller GA. Myocardial thallium-201 kinetics in normal and ischemic myocardium. *Circulation* **1981**; 3 : 610 – 618

Hamilton AJ, Huang SL, Warnick D, Rabbat M, Kane B, Nagaraj A, Klegerman M, McPherson DD. Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components *in vivo*. *J Am Coll Cardiol* **2004**; 43 : 453 – 460

Hardoff R, Braegelmann F, Zanzonico P, Herrold EM, Lees RS, Lees AM, Dean RT, Lister-James J, Borer JS. External imaging of atherosclerosis in rabbits using an ¹²³I-labeled synthetic peptide fragment. *J Clin Pharmacol* **1993**; 33 : 1039 – 1047

Hardoff R, Zanzonico P, Braegelmann F, Herrold EM, Lees RS, Lees AM, Dean RT, Lister-James J, Borer JS. Localisation of ^{99m}Tc-labeled ApoB synthetic peptide in arterial lesions of an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Am J Therap* **1995**; 2 : 88 – 99

Hattori Y, Azuma M, Kemmotsu O, Kanno M. Differential sensitivity of diabetic rat papillary muscles to negative inotropic effects of oxybarbiturates versus thiobarbiturates. *Anesth Analg* **1992**; 74 : 97 – 104

Hausmann D, Johnson JA, Krishnankutty S, Mullen WL, Friedrich G, Fitzgerald PJ, Chou TM, Ports TA, Kane JP, Malloy MJ, Yock PG. Angiographically silent atherosclerosis detected by intravascular ultrasound in patients with familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia: correlation with high density lipoproteins. *J Am Coll Cardiol* **1996**; 27 : 1562 – 1570

Havel RJ, Yamada N, Shames DM. Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, Animal model for familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* **1989**; 9 (Suppl I) : I-33 - I-38

Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JI, Rodriguez OJ, Fayad ZA, Fallon JT, Badimon JJ. Atherosclerotic aortic component quantification by non-invasive magnetic resonance imaging: an *in vivo* study in rabbits. *J Am Coll Cardiol* **2001**; 37 : 1149 – 1154

Herpin D, Paillard F. Facteurs de risque cardio-vasculaire et prévention. Thème 129. **2003** http://www.paris-ouest.univ-paris5.fr/hebergement/cec_mv/129a.pdf

Heymann MA, Payne BD, Hoffman JIE, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* **1977**; 20 : 55 – 79

Holly TA, Leppo JA, Gilmore MP, Reinhardt CP, Dahlberg ST. The effect of ischemic injury on the cardiac transport of Tc-N-NOET in the isolated rabbit heart. *J Nucl Cardiol* **1999**; 6 : 633 - 640

Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T, Sawamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003** ; 4 : 1274 – 1279

Hoshida S, Kato J, Nishino M, Egami Y, Takeda T, Kawabata M, Tanouchi J, Yamada Y, Kamada T. Increased angiotensin-converting enzyme activity in coronary artery specimens from patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. **2001**;103 : 630 – 633

Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rataou MC, Hanser KR, Silverstein SC. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol* **1993**; 120 : 1371 – 1380

Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* **2001**; 173 : 35 – 43

Hutchins GD, Schwaiger M, Rosenspire KC, Krivokapich J, Schelbert H, Kuhl DE. Noninvasive quantification of regional blood flow in the human heart using N-13 ammonia

and dynamic positron emission tomographic imaging. *J Am Coll Cardiol* **1990**; 15 : 1032 – 1042

Iiyama K, Hajra L, Liyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Pattern of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* **1999**; 85 : 199 – 207

Inoue S, Murakami Y, Ochiai K, Kitamura J, Ishibashi Y, Kawamitsu H, Sugimura K, Shimada T. The contributory role of interstitial water in Gd-DTPA-enhanced MRI in myocardial infarction. *J Magn Reson Imaging* **1999**; 9 : 215 – 219

Iuliano L, Signore A, Vallabajosula S, Colavita AR, Camastra C, Ronga G, Alessandri C, Sbarigia E, Fiorani P, Violi F. Preparation and biodistribution of ^{99m}technetium-labeled oxidized LDL in man. *Atherosclerosis* **1996**; 126 : 131 – 141

Janecek M, Patt BE, Iawncyk JS, MacDonald L, Yamaguchi Y, Strauss HW, Tsugita R, Ghazarossian V, Hoffman EJ. Intravascular probe for detection of vulnerable plaque. *Mol Imaging Biol* **2004**; 6 : 131 – 138

Jiahlal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adam-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy on high sensitive sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* **2001**; 103 : 1933 – 1935

Johnson GJ 3rd, Glover DK, Hebert CB, Okada RD. Early myocardial clearance kinetics of technetium-99m-teboroxime differentiate normal and flow-restricted canine myocardium at rest. *J Nucl Med* **1993**; 34 : 630 – 636

Johnson GJ 3rd, Glover DK, Hebert CB, Okada RD. Myocardial technetium 99m-labeled teboroxime clearance derived from canine scans differentiates severity of stenosis after dipyridamole. *J Nucl Cardiol* **1994**; 1 : 338 – 350

Johnson GJ 3rd, Glover DK, Hebert CB, Okada RD. Myocardial clearance kinetics of technetium-99m-teboroxime following dipyridamole: differentiation of stenosis severity in canine myocardium. *J Nucl Med* **1995**; 36 : 111 – 119

Johnson GJ 3rd, Allton IL, Nguyen KN, Lauinger JM, Beju D, Pasqualini R, Duatti A, Okada RD. Clearance of ^{99m}TcN-NOET in normal, ischemic-reperfused and membrane-disrupted rat myocardium. *J Nucl Cardiol* **1996**; 3 : 42 – 54

Johnson GJ 3rd, Nguyen BS JN, Pasqualini R, Okada RD. Interaction of ^{99m}TcN-NOET with blood elements: a potential mechanism of myocardial redistribution. *J Nucl Med* **1997**; 38 : 138 – 143

Johnson G 3rd, Nguyen KN, Liu Z, Gao P, Pasqualini R, Okada R. Planar imaging of ^{99m}Tc-labeled (bis(N-ethoxy, N-ethyl dithiocarbamate) nitrido technetium (V)) can detect resting ischemia. *J Nucl Cardiol* **1997**⁽²⁾; 4 : 217 – 225

- Johnson** LL, Narula N, Schofield L, Chaves L, Narula J. 99mTc-Annexin V imaging for detection of atherosclerotic lesions in porcine coronary artery. ACC 2003 835-3. *J Am Coll Cardiol* **2003**; 19: 445A
- Jones** AG, Abrams MJ, Davison A, Brodack JW, Toothaker AK, Adelstein SJ, Kassis AI. Biological studies of a new class of technetium complexes: the hexakis (alkylisonitrile) technetium (I) cations. *Int J Nucl Med Biol* **1984**; 11 : 225 - 234
- Kannel** WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* **1979**; 241 : 2035 – 2038
- Kao** CH, Chen JK, Yang VC. Ultrastructure and permeability of endothelial cells in branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis* **1994** 105 : 97 – 114
- Kelly** JD, Forster AM, Higley B, Archer CM, Booker FS, Canning LR, Chiu KW, Edwards B, Gill HK, McPartlin M, Nagle KR, Latham IA, Pickett RD, Storey AE, Webbon PM. Technetium-99-m Tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med* **1993**; 34 : 222 – 227
- Kietselaer** BL, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, Daemen MJ, Mess WH, Hofstra L, Narula J. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. *N Engl J Med* **2004**; 350: 1472 – 1473
- Kinley** S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr opin Lipidol* **2001**; 12 : 383 – 389
- Kita** T, Broawn MS, Watanabe Y, Goldstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1981** 78 : 2268 – 2272
- Kloner** RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974; 54 : 1486 – 1508
- Kolodgie** FD, Petrov A, Viramani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CPM, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabelled annexin V. *Circulation* **2003**; 108: 3134 - 3139
- Kondo** T, Watanabe Y. A heritable hyperlipidemic rabbit. *Exp Anim* **1976**; 24 : 89 – 94
- Kondos** G, Hoff J, Serukov A, Daviglus M, Garside D, Devries S, Chomka E, Liu K. Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events. *Circulation* **2003**; 107 : 2571 – 2576
- Kooi** ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ, van Engelsehoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detect by *in vivo* magnetic resonance imaging. *Circulation* **2003**; 107 : 2453-2438

- Kopka K**, Breyholz HJ, Wagner S, Law MP, Riemann B, Schröer S, Trub M, Guilbert B, Levkau B, Schober O, Schäfers M. Synthesis and preliminary biological evaluation of new radioiodinated MMP inhibitors for imaging MMP activity *in vivo*. *Nucl Med Biol* **2004**; 31 : 257 – 267
- Kovanen PT**, Pentikäinen M. Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* **2003**; 14 : 411 – 419
- Krivokapitch J**, Shine KI. Effects of hyperkalemia and glycoside on thallium exchange in rabbit ventricle. *Am J Physiol* **1981**; 240 : H612 - H619
- Kronauge JF**, Chiu ML, Cone JS, Davison A, Holman BL, Jones AG, Piwnica-Worms D. Comparison of neutral and cationic myocardial perfusion agents : characteristics of accumulation in cultured cells. *Int J Rad Appl Instrum B* **1992**; 19 : 141 – 148
- Ku DN**, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotide bifurcation : positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* **1985**; 5 : 293 – 302
- Kume Noriaki**, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leucocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* **1992**, 90 : 1138 – 1144
- Kwak B**, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmunity Rev* **2003**; 2 : 332 – 338
- Laine H**, Raitakari O, Niinikoski H, Pitkänen OP, Iida H, Viikari J, Nuutila P, Knuuti J. Early impairment of coronary flow reserve in young men with borderline hypertension. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 32 : 147 – 153
- Lebowitz E**, Greene MW, Fairchild R, Bradley-Moore PR, Atkins HL, Ansari AN, Richards P, Belgrave E. Thallium-201 for medical use. *J Nucl Med* **1975**; 16 : 151 – 155
- Lecompte T**. Médicaments antiplaquettaires et leurs managements. *Rev Prat* **1999** ; 49 : 1627 – 1633
- Lederman RJ**, Raylman RR, Fisher SJ, Kison PV, San H, Nabel EG, Wahl RL. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl Med Comm* **2001**; 22 : 747 – 753
- Lees RS**, Lees AM, Strauss WS. External imaging of human atherosclerosis. *J Nucl Med* **1983**; 24 : 154 – 156
- Lees AM**, Lees RS, Schoen FJ, Isaacsohn JL, Fischman AJ, McKusick KA, Strauss HW. Imaging human atherosclerosis with 99mTc-labeled low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* **1988**; 8 : 461 – 470
- Leitinger N**. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **2003**; 14 : 421 – 430

- Leon AS, Sanchez O.** Meta-analysis of the effect of aerobic exercise training on blood lipids. *Circulation* **2001**; 104(Suppl II) : II-414 - II-415
- Leoni J.** Physiopathologie de l'athérosclérose mécanismes et prévention de l'athérombose. *Thèse de l'Université de Besançon* **2001**. <http://www.123bio.net/revues/jleoni/>
- Leppo JA, Macneil PB, Moring AF, Apstein CS.** Separate effects of ischemia, hypoxia, and contractility on thallium-201 kinetics in rabbit myocardium. *J Nucl Med* **1986**; 27 : 66 – 74
- Leppo JA.** Myocardial uptake of thallium and rubidium during alterations in perfusion and oxygenation in isolated rabbit hearts. *J Nucl Med* **1987**; 28 : 878 – 885
- Leppo JA, Meerdink DJ.** Comparison of the myocardial uptake of a technetium-labeled isonitrile analogue and thallium. *Circ Res* **1989**; 65 : 632 – 639
- Leppo JA, Meerdink DJ.** Comparative myocardial extraction of two technetium-labeled BATO derivatives (SQ30217, SQ32014) and thallium. *J Nucl Med* **1990**; 31 : 67 – 74
- Levin DC, Fallon JT.** Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: histopathologic correlations. *Circulation* **1982**; 66 : 316 – 320
- Ley K, Huo Y.** VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* **2001**; 107: 1209 – 1210
- Li QS, Frank TL, Franceschi D, Wagner HN, Becker LC.** Technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile (RP30) for quantification of myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *J Nucl Med* **1988**; 29 : 1539 – 1548
- Li AC, Glass CK.** The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Med* **2002**; 8 : 1235 – 1242
- Li QS, Solot G, Frank , Wagner HN, Becker LC.** Myocardial redistribution of technetium 99m-methoxyisobutyl isonitrile (SESTAMIBI). *J Nucl Med* **1990**; 31 : 1069 – 1076
- Libby P.** Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. **1995**; 91: 2844 - 2850
- Libby P.** Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **2002**; 420: 868 – 874
- Libby P, Aikawa M.** Mechanisms of plaque stabilisation with statins. *Am J Cardiol* **2003**; 91(suppl) : 4B - 8B
- Lima RS, Watson DD, Goode AR, Siadaty MS, Ragosta M, Beller GA, Samady H.** Incremental value of combined perfusion and function over perfusion alone by gated SPECT myocardial perfusion imaging for detection of severe three-vessel coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **2003**; 42 : 64 – 70
- Lin SJ, Jan KM, Chien S.** Role of dying endothelial cells in transendothelial macromolecular transport. *Arteriosclerosis* **1990**;10 : 703 – 709

- Ling X**, Tamaki T, Xiao Y, Kamangar S, Clayberger C, Lewis BD, Krensky AM. An immunosuppressive and anti-inflammatory HLA class I-derived peptides binds vascular cell adhesion molecule-1. *Transplantation*. **2000**; 70: 662 – 667
- LIPID**. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* **1998**; 339 : 1349 – 1357
- Little WC**, Constantinescu M, Applegate RJ, Kutcher MA, Burrows MT, Kahl FR, Santamore WP. Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease? *Circulation* **1988**; 78 : 1157 – 1166
- Llaurado JG**, Smith GA, Madden JA, Meade RC. Partition of thallium-201 in isolated myocardial tissue of rats previously injected at rest or after exercise. *J Nucl Med* **1979**; 20 : 1136 – 1141
- Lowry OH**, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 193 : 265 – 275
- Mach F**, Schoenbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* **1998**; 137 : S89 - S95
- Machecourt J**, Longère P, Fagret D, Vanzetto G, Wolf JE, Polidori C, Comet M, Denis B. Prognostic value of thallium-201 single-photon emission computed tomographic myocardial perfusion imaging according to extent of myocardial defect - study in 1,926 patients with follow-up at 33 months. *J Am Coll Cardiol* **1994**; 23 : 1096 – 1106
- MacNeill BD**, Lowe HC, Takano M, Fuster V, Jang IK. Intravascular modalities for detection of vulnerable plaque current status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23 : 1333 – 1342
- Madjid M**, Zarrabi A, Litovsky S, Willerson JT, Casscells W. Finding vulnerable atherosclerotic plaques. Is it worth the effort? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2004**;24 : 1775 – 1782
- Malek A**, Alper S, Izumo S, Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *J Am Med Ass* **1999**; 282(21): 2035 – 2042
- Mallat Z**, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in human atherosclerotic plaques. Relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999** ; 19 : 611 – 616
- Mallat Z**, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* **2001**; 88 : 998 – 1003
- Mangelsdorf DJ**, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. **1990** May 17; 345 : 224 – 229

Marshall RC, Leidholdt EM, Zhang DY, Barnett CA. Technetium-99m hexakis 2-methoxy-2-isobutyl isonitrile and thallium-201 extracton, washout, and retention at varying coronary flow rates in rabbit heart. *Circulation* **1990**; 82 : 998 – 1007

Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisomes proliferator-activated receptors and etherogenesis. Regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* **2004**; 94 : 1168 – 1178

Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* **1998**; 97 : 795 – 804

Maublant JC, Gachon P, Moins N. Hexakis (2-methoxy isobutylisonitrile) technetium-99m and thallium-201 chloride: uptake and release in cultured myocardial cells. *J Nucl Med* **1988**; 29 : 48 – 54

Maublant JC, Moins N, Gachon P. Uptake and release of two new ^{99m}Tc labeled myocardial blood flow imaging agents in cultured cardiac cells. *Eur J Nucl Med* **1989**; 15 : 180 – 182

Maublant JC, Moins N, Gachon P, Renoux M, Zhang Z, Veyre A. Uptake of technetium-99m-Teboroxime in cultured myocardial cells : comparison with Thallium-201 and technetium-99m-Sestamibi. *J Nucl Med* **1993**; 34 : 255 – 259

Maublant JC, Zhang Z, Rapp M, Ollier M, Michelot J, Veyre A. In vitro uptake of technetium-99m-Teboroxime in carcinoma cell lines and normal cells : comparison with technetium-99m-Sestamibi and Thallium 201. *J Nucl Med* **1993**⁽²⁾; 34 : 1949 – 1952

Mays AE, Cobb FR. Relationship between regional myocardial blood flow and thallium-201 distribution in the presence of coronary artery stenosis and dipyridamole-induced vasodilation. *J Clin Invest* **1984**; 73 : 1359 – 1366

McCall D, Zimmer LJ, Katz AM. Kinetics of thallium exchange in cultured myocardial cells. *Circ Res* **1985**; 56 : 370 – 376

McGoron AJ, Gerson MC, Biniakiewicz DS, Washburn LC, Millard RW. Effects of ouabain on technetium-99m-Q12 and thallium 201 extraction and retention by isolated rat heart. *J Nucl Med* **1996**; 37 : 752 – 756

Meding J, Dinkelborg LM, Grieshaber MK, Semmler W. Targeting of endothelin receptors for molecular imaging of atherosclerosis in rabbits. *J Nucl Med* **2002**; 43 : 400 – 405

Meerdink DJ, Leppo JA. Comparison of hypoxia and ouabain effects on the myocardial uptake kinetics of technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile and thallium-201. *J Nucl Med* **1989**; 30 : 1500 – 1506

Mehri Y, Arsenault A, Latour JG. Time course of technetium-99m sestamibi myocardial distribution in dogs with a permanent or transient coronary occlusion. *Eur J Nucl Med* **1994**; 21 : 481 – 487

- Melin** JA, Becker LC, Bulkley BH. Differences in thallium-201 uptake in reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Circ Res* **1983**; 53 : 414 – 419
- Melin** JA, Becker LC. Quantitative relationship between global left ventricular thallium uptake and blood flow: effects of propranolol, ouabain, dipyridamole, and coronary artery occlusion. *J Nucl Med* **1986**; 27 : 641 – 652
- Melon** PG, Beanlands RS, DeGrado TR, Nguyen N, Petry NA, Schwaiger M. Comparison of technetium-99m sestamibi and thallium-201 retention characteristics in canine myocardium. *J Am Coll Cardiol* **1992**; 20 : 1277 – 1283
- Mintz** GS, Painter JA, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Chuang YC, Bucher TA, Sokolowicz LE, Leon MB. Atherosclerosis in angiographically « normal » coronary artery reference segments: an intravascular ultrasound study with clinical correlations. *J Am Coll Cardiol* **1995**; 25 : 1479 – 1485
- Mitchel** J, Waters D, Lai T, White M, Alberghini T, Salloum A, Knibbs D, Li D, Heller GV. Identification of coronary thrombus with a IIb/IIIa platelet inhibitor radiopharmaceutical, technetium-99m DMP-444. *Circulation* **2000**; 101 : 1643 – 1646
- Mizuno** K, Miyamoto A, Satomura K, Kurita A, Arai T, Sakurada M, Yanagida S, Nakamura H. Angioscopic coronary macromorphology in patients with acute coronary disorders. *Lancet* **1991**; 337 : 809 – 812
- Morel** DW, Hessler JR, Chisholm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* **1983**; 24 : 1070 – 1076
- Moreno** PR, Ryan SE, Hopkins D, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor W, Muller JE. Identification of lipid-rich aortic atherosclerotic plaques in living rabbits with near infrared spectroscopy catheter. Abstract ACCIS. *J Am Coll Cardiol* **2001**; 37 (Suppl 1) : A3
- Moreno** PR, Muller JE. Identification of high-risk atherosclerotic plaques: a survey of spectrometric methods. *Curr Opin Cardio* **2002**; 17 : 638 – 647
- Moreno** PR, Lodder RA, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor WN, Muller JE. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy. *Circulation* **2002**⁽²⁾; 105 : 923 – 927
- Moreno** PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* **2004** ; 110 : 2032 – 2038
- Morishima** I, Sone T, Okumura K, Tsuboi H, Kondo J, Mukawa H, Matsui H, Toki Y, Ito T, Hayakawa T. Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **2000**; 36 : 1202 – 1209

Morrel EM, Holland JA, Pritchard KA, Colton CK, Stemerman MB. Endothelial cell perturbation and low-density lipoprotein. Quantitative autoradiography. *Ann N Y Acad Sci* **1987**; 516 : 412 – 417

Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* **1989**; 256 : C799 - C806

Mousa SA, Cooney JM, Williams SJ. Relationship between regional myocardial blood flow and the distribution of ^{99m}Tc-sestamibi in the presence of total coronary artery occlusion. *Am Heart J* **1990**; 119 : 842 - 847

Mousa WF, Enoki T, Fukuda K. Thiopental induces contraction of rat aortic smooth muscle through Ca(2+) release from the sarcoplasmic reticulum. *Anesth Analg* **2000**; 91 : 62 – 67

Mugbawa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc Res* **1996**; 32 : 797 – 813

Mullani NA, Gould KL. First-pass measurements of regional blood flow with external detectors. *J Nucl Med* **1983**; 24 : 577 – 581

Muller WA. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* **2003**; 24 : 326 – 333

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* **2003**; 108: 1664 – 1672

Nahser PJ, Brown RE, Oskarsson H, Winniford MD, Rossen JD. Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus. *Circulation* **1995**; 91 : 635 – 640

Nakamura K, Sammiya T, Hashimoto J, Ishibashi R, Matsumoto K, Kubo A. Comparison of cationic myocardial perfusion agents: characteristics of accumulation in cultures smooth muscle cells. *Ann Nucl Med* **1996**; 10 : 375 – 381

Nakamura M, Lee DP, Yeung AC. Identification and treatment of vulnerable plaque. *Rev Cardiovasc Med* **2004**; 5(Suppl) : S22 - S33

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **1997**; 100 : 2680 – 2690

- Narra** RK, Nunn AD, Kuczynski BL, Feld T, Wedeking P, Eckelman WC. A neutral technetium-99m complex for myocardial imaging. *J Nucl Med* **1989**; 30 : 1830 – 1837
- Narula** J, Petrov A, Bianchi C, Ditlow CC, Lister BC, Dilley J, Pieslak I, Chen FW, Torchilin VP, Khaw BA. Noninvasive localisation of experimental atherosclerotic lesions with mouse/human chimeric Z2D3 F(ab')₂ specific for the proliferating smooth muscle cells of human atheroma. Imaging with conventional and negative charge-modified antibody fragments. *Circulation* **1995**; 92 : 474 – 484
- Narula** J, Petrov A, O'Donnell SM, Ditlow C, Pieslak I, Dilley J, Chen F, Khaw BA. Gamma imaging of atherosclerotic lesions: the role of antibody affinity in in vivo target localization. *J Nucl Cardiol* **1996**; 3 : 231 – 241
- Narula** J, Petrov A, Pak KY, Ditlow C, Chen F, Khaw BA. Noninvasive detection of atherosclerotic lesions by ^{99m}Tc-based immunoscintigraphic targeting of proliferating smooth muscle cells. *Chest* **1997**; 111 : 1684 – 1690
- Navab** M, Hama SY, Reddy ST, Ng CJ, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM, Ready ST. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* **2002**; 13 : 363 – 372
- Naylor** WG. Calcium antagonists. Academic Press. Harcourt, Brace, Jovanovich, publishers **1988**
- Nemirovsky** D. Imaging of high-risk plaque. *Cardiology* **2003**; 100 : 160 – 175
- Neugebauer** G. Comparative cardiovascular actions of verapamil and its major metabolites in the anaesthetized dog. *Cardiovasc Res* **1978**; 12 : 247 – 254
- Nielsen** AP, Morris KG, Murdock R, Bruno FP, Cobb FR. Linear relationship between the distribution of thallium 201 and blood flow in ischemic and nonischemic myocardium during exercise. *Circulation* **1980**; 61 : 797 – 801
- Nielsen** LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1996**; 123 : 1 - 15
- Nissen** SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical implications. *Circulation* **2001**; 103 : 604 - 616
- Nissen** SE, Tuzcu EM, Libby P, Thompson PD, Ghali M, Garza D, Berman L, Shi H, Buebendorf E, Topol EJ; CAMELOT Investigators. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *JAMA* **2004**; 292 : 2217 – 2225
- Nobuyoshi** M, Tanaka M, Nosaka H, Kimura T, Yokoi H, Hamasaki N, Kim K, Shindo T, Kimura K. Progression of coronary atherosclerosis: is coronary spasm related to progression? *J Am Coll Cardiol* **1991**; 18 : 904 – 910

- Nossner** E, Golberg JE, Naftzger C, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat-shock protein 70 family. *J Exp Med* **1996**; 183: 339 – 348
- O'Brien** KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **1993**; 92: 945 – 951
- O'Brien** KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. *Circulation* **1996**; 93 : 672 – 682
- Ogawa** M, Ishino S, Mukai T, Asana D, Teramoto N, Watabe H, Kudomi N, Shiomi M, Magata Y, Iida H, Saji H. ¹⁸F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. *J Nucl Med* **2004**; 45: 1245 – 1250
- Ohtsuki** K, Hayase M, Akashi K, Kapiwoda S, Strauss HW. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental atherosclerotic lesions. *Circulation* **2001**; 104: 203 – 208
- Okada** RD, Jacobs ML, Daggett WM, Leppo J, Strauss HW, Newell JB, Moore R, Boucher CA, O'Keefe D, Pohost GM. Thallium-201 kinetics in nonischemic canine myocardium. *Circulation* **1982**; 65 : 70 – 77
- Okada** RD, Leppo JA, Boucher CA, Pohost GM. Myocardial kinetics of thallium-201 after dipyridamole infusion in normal canine myocardium and in myocardium distal to a stenosis. *J Clin Invest* **1982**⁽²⁾; 69 : 199 – 209
- Okada** RD, Glover DK, Gaffney T, Williams S. Myocardial kinetics of technetium-99m-hexakis-2-methoxy-2-methylpropyl-isonitrile. *Circulation* **1988**; 77 : 491 – 498
- Okada** RD, Glover DK, Nguyen KN, Johnson G. Technetium-99m sestamibi kinetics in reperfused canine myocardium. *Eur J Nucl Med* **1995**; 22 : 600 – 607
- Okada** RD, Nguyen KN, Lauinger M, Allton IL, Spreitzer K, Beju D, Johnson G 3rd. Effects of no flow and reperfusion on technetium-99m-Q12 kinetics. *J Nucl Med* **1995**⁽²⁾; 36 : 2103 – 2109
- OMS**. Rapport annuel 2003 chapitres 1&6 et centre de surveillance des maladies cardiovasculaires pour l'OMS. <http://www.who.int>
- Opie** LH. The heart - physiology and metabolism (second edition). **1992**; *Raven Press*, New York.
- Ord** JM, Hasapes J, Daugherty A, Thorpe SR, Bergmann SR, Sobel BE. Imaging of thrombi with tissue-type plasminogen activator rendered enzymatically inactive and conjugated to a residual label. *Circulation* **1992**; 85 : 288 – 297

Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyk S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **1989**; 59 : 1203 – 1211

Pagel PS, Hettrick DA, Lowe D, Gowrie PW, Kersten JR, Bosnjak ZJ, Warltier DC. Cardiovascular effects of verapamil enantiomer combinations in conscious dogs. *Eur J Pharmacol* **1998**; 348 : 213 – 221

Parkash R, deKemp RA, Ruddy Td T, Kitsikis A, Hart R, Beauschene L, Williams K, Davies RA, Labinaz M, Beanlands RS. Potential utility of rubidium 82 PET quantification in patients with 3-vessel coronary artery disease. *J Nucl Cardiol* **2004** 11 : 440 – 449

Pasqualini R, Duatti A, Bellande E, Comazzi V, Brucato V, Hoffschir, Fagret D, Comet M. Bis (Dithiocarbamate) Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: A class of neutral myocardial imaging agents. *J Nucl Med* **1994**; 35 : 334 – 341

Peters T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. San Diego, CA: Academic Press; **1996**

Petrov A, Hartung D, Kolodgie F, Narula N, Haider N, Kohut A, Virmani R, Narula J. Imaging inflammation in atherosclerotic lesions by radiolabeled chemotactic peptide: would identification of vulnerable plaques become feasible? ACC 2003 835-1. *J Am Coll Cardiol* **2003**; 19: 445-A

Petruzella FD, Ruiz M, Katsiyannis P, Waton DD, Pasqualini R, Beller GA, Glover DK. Optimal timing for initial and redistribution 99m-N-NOET image acquisition. *J Nucl Cardiol* **2000**; 7 : 123 – 131

Piwnica-Worms D, Kronauge JF, Delmon L, Holman BL, Marsh JD, Jones AG. Effect of metabolic inhibition on Technetium-99m-MIBI kinetics in cultured chick myocardial cells. *J Nucl Med* **1990**; 31 : 464 – 472

Piwnica-Worms D, Kronauge JF, Chiu ML. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium (I) in cultured chick myocardial cells - mitochondrial and plasma membrane potential dependence. *Circulation* **1990**⁽²⁾; 82 : 1826 – 1838

Piwnica-Worms D, Kronauge JF, Chiu ML. Enhancement by tetraphenylborate of technetium-99m-MIBI uptake kinetics and accumulation in cultured chick myocardial cells. *J Nucl Med* **1991**; 32 : 1992 – 1999

Piwnica-Worms D, Chiu ML, Kronauge JF. Divergent kinetics of ²⁰¹Tl and ^{99m}Tc-SESTAMIBI in cultured chick ventricular myocytes during ATP depletion. *Circulation* **1992**; 85 : 1531 – 1541

Piwnica-Worms D, Kronauge JF, LeFurgey A, Backus M, Hockett D, Ingram P, Lieberman M, Holman BL, Jones AG, Davison A. Mitochondrial localization and characterization of Tc-sestamibi in heart cells by electron probe X-ray microanalysis and 99Tc-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance Imaging* **1994**; 12 : 641 – 652

- Platts** EA, North TL, Pickett RD, Kelly JD. Mechanism of uptake of technetium-tetrofosmin. I: Uptake into isolated adult rat ventricular myocytes and subcellular localization. *J Nucl cardiol* **1995**; 2 : 317 – 326
- Pohost** GM, Okada RD, O’Keefe DD, Gewirtz H, Beller GA, Strauss WS, Chaffin JS, Leppo J, Daggett WM : Thallium redistribution in dogs with severe coronary artery stenosis of fixed caliber. *Circ Res* **1981**; 48 : 439 – 446
- Pohost** GM, Zir LM, Moore RH, McKusick KA, Guiney TE, Beller GA. Differentiation of transiently ischemic from infarcted myocardium by serial imaging after a single dose of thallium 201. *Circulation* **1977**; 55 : 294 – 302
- Ramos** LC, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin-and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* **1999**; 84 : 1237 – 1244
- Rauch** B, Kübler W; Kinetics of cellular uptake of tracers used in myocardial scintigraphy. *Basic Res Cardiol* **1985**; 80 (suppl 1): 65 – 68
- Reddy** KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **1994**; 23 : 833 – 843
- Reffelmann** T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*. **2003**; 108 : 2911 – 2917
- Repa** JP, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nature* **2002**; 8 : 1243 – 1248
- Rice** GE, Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* **1989**; 246 : 1303 – 1306
- Rice** GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes : a CD11-CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp Med* **1990**; 171 : 1369 – 1374
- Riou** L, Ghezzi C, Mouton O, Mathieu JP, Pasqualini R, Comet M, Fagret D. Cellular uptake mechanisms of ^{99m}TcN-NOET in cardiomyocytes from newborn rats. Calcium channel interaction. *Circulation* **1998**; 98 : 2591 – 2597
- Riou** L. Mécanismes de fixation cellulaire de ^{99m}TcN-NOET, un nouveau traceur radioactif de la perfusionmyocardique. *Thèse de l’Université Joseph Fourier*. **1999**
- Riou** L, Ghezzi C, Pasqualini R, Fagret D. Influence of calcium channel inhibitors on the myocardial uptake and retention of technetium 99m N-NOET, a new myocardial perfusion imaging agent : a study on isolated perfused rat hearts. *J Nucl Cardiol* **2000**; 7 : 365 – 372

Riou LM, Unger S, Toufektsian MC, Ruiz M, Watson DD, Beller GA, Glover DK. Effects of increased lipid concentration and hyperemic blood flow on the intrinsic myocardial washout kinetics of $^{99m}\text{TcN-NOET}$. *J Nucl Med* **2003**; 44 : 1092 – 1098

Rivas F, Cobb FR, Bache RJ, Greenfield JC. Relationship between blood flow to ischemic regions and extent of myocardial infarction. *Circ Res* **1976**; 38 : 439 – 447

Rochitte CE, Lima JA, Bluemke DA, Reeder SB, McVeigh ER, Furuta T, Becker LC, Melin JA. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. *Circulation* **1998**; 98 : 1006 - 1014

Rogers WJ, Prichard JW, Hu YL, Olson PR, Benckart DH, Kramer CM, Vido DA, Reichek N. Characterization of signal properties in atherosclerotic plaque components by intravascular MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**; 20 : 1824 – 1830

Rosenspire KC, Rumsey WL, Jurisson S, Hirth W, Narra RK. [^{99m}Tc]teboroxime and [^{99m}Tc]Cl(DMG)₃B2MP: binding characteristics and metabolism of two [^{99m}Tc]BATOs in blood and tissues. *Nucl Med Biol* **1993**; 20 : 395 – 400

Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**; 340 : 115 – 126

Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, Johnstrom P, Davenport AP, Kirkpatrick PJ, Arch BN, Pickard JD, Weissberg PL. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [^{18}F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* **2002**; 105 : 2708 – 2711

Ruehm SG, Corot C, Vogt P, Kolb S, Debatin JF. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **2001**; 103 : 415 – 422

Rumsey WL, Rosenspire KC, Nunn AD. Myocardial extraction of teboroxime: effects of teboroxime interaction with blood. *J Nucl Med* **1992**; 33 : 94 - 101

4S. Scandinavian Simvastatin Survival Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet*. **1994**; 344

Sakurai K, Sawamura T. Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J Pharmacol Sci* **2003**; 91 : 182 - 186

Saltzman AJ, Waxman SW. Angioscopy and ischemic heart disease. *Curr Op Cardiol*. **2002**; 17 : 633 – 637

Sansoy V, Glover DK, Watson DD, Ruiz M, Smith WH, Simanis JP, Beller GA. Comparison of thallium-201 resting redistribution with technetium-99m-sestamibi uptake and functional response to dobutamine for assessment of myocardial viability. *Circulation* **1995**; 92 : 994 – 1004

- Sapirstein** LA. Regional blood flow by fractional distribution of indicators. *Am J Physiol* **1958**; 193 : 161 – 168
- Savage** RM, Guth B, White FC, Hagan AD, Bloor CM. Correlation of regional myocardial blood flow and function with myocardial infarct size during acute myocardial ischemia in the conscious pig. *Circulation* **1981**; 64 : 699 - 707
- Schaar** JA, De Korte CL, Mastik F, Stijder C, Pasterkamp G, Boersma E, Serruys PW, Van der Steen AF. Characterizing vulnerable plaque features with intravascular elastography. *Circulation* **2003**; 108 : 2636 – 2641
- Schafers** M, Rieman B, Kopka K, Breyholz HJ, Wagner S, Schafers KP, Law MP, Schober O, Levkau B. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation* **2004**; 109: 2554 – 2559
- Schelbert** HR, Wisenberg G, Phelps ME, Gould KL, Henze E, Hoffman EJ, Gomes A, Kuhl DE. Noninvasive assessment of coronary stenoses by myocardial imaging during pharmacologic coronary vasodilatation. VI. Detection of coronary artery disease in human beings with intravenous N-13 ammonia and positron computed tomography. *Am J Cardiol* **1982**; 49 : 1197 – 1207
- Schenkel** AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocyte through endothelial junctions. *Nat Immunol* **2002**; 3 : 143 – 150
- Schieffer** B, Drexler H. Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* **2003**; 91(Suppl) : 12H - 18H
- Schonbeck** U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes. *Circ Res* **1997**; 81 : 448 – 454
- Schonbeck** U, Libby P. Inflammation, immunity and HMG-CoA reductase inhibitors statins as antiinflammatory agents? *Circulation* **2004** (Suppl II) : II-18 - II-26
- Schwartz** JS, Ponto R, Carlyle P, Forstrom L, Cohn JN. Early redistribution of thallium-201 after temporary ischemia. *Circulation* **1978**; 57 : 332 – 335
- Schwartz** BR, Wayner EA, Carlos TM, Ochs HD, Harlan JM. Identification of surface proteins mediating adherence of CD11/CD18-deficient lymphoblastoid cells to cultured human endothelium. *J Clin Invest* **1990**; 85 : 2019 – 2022
- Schwartz** GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. For the myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study investigator. Effect of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes : the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* **2001**; 285 : 1711 – 1718

Schwartzkopff B, Mundhenke M, Strauer BE. Alterations of the architecture of subendocardial arterioles in patients with hypertrophic cardiomyopathy and impaired coronary vasodilator reserve: a possible cause for myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 31 : 1089 – 1096

Sciacca RR, Hickey KT, Chou R-L, Bergmann SR. Comparison of myocardial blood flow estimates with H₂¹⁵O and ¹³NH₃ – effect of model configuration [abstract] *J Nucl Med* **2001**; 42 : 187P

Seethala R. Fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases. *Methods* **2000**; 22 : 61 – 70

Sehweil AM, McKillop JH, Milroy R, Wilson R, Abdel-Dayem HM, Omar YT. Mechanism of ²⁰¹Tl uptake in tumours. *Eur J Nucl Med* **1989**; 15 : 376 – 379

Sessler MJ, Geck P, Maul FD, Hör G, Munz DL. New aspects of cellular thallium uptake: Tl⁺-Na⁺-2Cl⁻ cotransport is the central mechanism of ion uptake. *Nucl Med* **1986**; 25 : 24 – 27

Shah A, Schelbert HR, Schwaiger M, Henze E, Hansen H, Selin C, Huang SC. Measurement of regional myocardial blood flow with N-13 ammonia and positron-emission tomography in intact dogs. *J Am Coll Cardiol* **1985**; 5 : 92 – 100

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* **1995**; 333 : 1301 – 1307

Shintani Y, Ito H, Iwakura K, Kawano S, Tanaka K, Masuyama T, Hori M, Fujii K. Usefulness of impairment of coronary microcirculation in predicting left ventricular dilation after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **2004**; 93 : 974 – 978

Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Ueda M. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb* **1994**; 14 : 931 – 937

Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* **1997**; 79 : 2 – 10

Sinusas AJ, Watson DD, Cannon JM, Beller GA. Effect of ischemia and postischemic dysfunction on myocardial uptake of technetium-99m-labeled methoxyisobutyl isonitrile and thallium 201. *J Am Coll Cardiol* **1989**; 14 : 1785 – 1793

Sinusas AJ, Bergin JD, Edwards NC, Watson DD, Ruiz M, Makuch RW, Smith WH, Beller GA. Redistribution of ^{99m}Tc-sestamibi and ²⁰¹Tl in the presence of a severe coronary artery stenosis. *Circulation* **1994**; 89 : 2332 – 2341

Sinusas AJ, Shi QS, Saltzberg MT, Vitols P, Jain D, Wackers FJ Th, Zaret BL. Technetium-99m-tetrofosmin to assess myocardial blood flow: experimental validation in an intact canine model of ischemia. *J Nucl Med* **1994**⁽²⁾; 35 : 664 – 671

Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J Lipid Res* **2003**; 44 : 705 – 715

Stary H, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull WJr, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Special report. Arterioscler Thromb* **1994**; 14: 840 – 856

Stary H, Chair C, Bleakley A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull WJr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Colin J, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, *American Heart Association. Special report. Circulation* **1995**; 92 : 1355 – 1374

Stary H. An atlas of atherosclerosis progression and regression. *Ed Hardcover* **1999**

Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, Tsiamis E, Dernellis J, Toutouzas K, Tousoulis D, Stefanadi E, Toutouzas P. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected *in vivo*: a new method of detection by application of a special thermography catheter. *Circulation* **1999**; 99 : 1965 – 1971

Stefanadis C, Toutouzas K, Tsiamis E, Mitropoulos I, Tsioufis C, Kallikazaros I, Pitsavos C, Toutouzas P. Thermal heterogeneity in stable human coronary atherosclerotic plaque is underestimated *in vivo* : the “cooling effect” of blood flow. *J Am Coll Cardiol* **2003**; 41 : 403 – 408

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **1989**; 320 : 915 – 924

Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partner in crime. *Nature medicine* **2002**; 8 : 1211 – 1217

Steven A, Lowe J. Histologie humaine. *DeBoeck Université*, **1997**

Stewart RE, Schwaiger M, Hutchins GD, Chiao PC, Gallagher KP, Petry NA, Rogers WL. Myocardial clearance kinetics of technetium-99m-SQ30217: a marker of regional myocardial blood flow. *J Nucl Med* **1990**; 31 : 1183 – 1190

Stewart RE, Heyl B, O'Rourke RA, blumhardt R, Miller DD. Demonstration of differential post-stenotic myocardial technetium-99m-teboroxime clearance kinetics after experimental ischemia and hyperemic stress. *J Nucl Med* **1991**; 32 : 2000 – 2008

Strauss HW, Harrison K, Langan JK, Lebowitz E, Pitt B. Thallium-201 for myocardial imaging - Relation of Thallium-201 to regional myocardial perfusion. *Circulation* **1975**; 51 : 641 – 645

Strauss HW, Blankenberg FG. Small is beautiful: specialty imaging devices and the growth of nuclear cardiology. *J Nucl Med* **2000**; 7: 175 – 179

Strauss HW, Narula J, Blankenberg FG. Radioimaging to identify myocardial cell death and probably injury. *The Lancet* **2000**⁽²⁾; 356: 180 – 181

Taichman DB, Cybulsky MI, Djaffar I, Longenecker BM, Teixido J, Rice E, Aruffo A, Bevilacqua MP. Timor cell surface $\alpha^4\beta_1$ integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell regulation* **1991**; 2 : 347 – 355

Takahashi N, Dahlberg ST, Gilmore MP, Leppo JA. Effects of acute ischemia and reperfusion on the myocardial kinetics of technetium 99m-labeled tetrofosmin and thallium-201. *J Nucl Cardiol* **1997**; 4 : 524 – 531

Takeda K, Schini V, Stoeckel H. Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch* **1987**; 410 : 385 – 393

Takehana K, Beller GA, Ruiz M, Petruzella FD, Watson DD, Glover DK. Assessment of residual coronary stenosis using ^{99m}Tc-N-NOET vasodilator stress imaging to evaluate coronary flow reserve early after coronary reperfusion in a canine model of subendocardial infarction. *J Nucl Med* **2001**; 42 : 1388 – 1394

Tearney GJ, Yabushita H, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Halpern EF, Bouma BE. Quantification of macrophages content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation* **2003**; 107 : 113 – 119

Tepe G, Duda SH, Meding J, Brehme U, Ritter J, Hanke H, Hilger CS, Claussen CD, Dinkelborg LM. Tc-99m-labeled endothelin derivative for imaging of experimentally induced atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2001**; 157 : 383 – 392

Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK; American Heart Association Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Subcommittee on Physical Activity. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* **2003**; 107 : 3109 – 3116

Thuillez C, Maury M, Giudicelli JF. Differential effects of verapamil and diltiazem on regional blood flow and function in the canine normal and ischemic myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* **1983**; 5 : 19 – 27

Toussaint JF, LaMuraglia GM, Southern JF, Fuster V, Kantor HL. Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis *in vivo*. *Circulation* **1996**; 94 : 932 – 938

Toussaint JF, Jacob MP, Lagrost L, Chapman J. L'athérosclérose Physiologie, diagnostics, thérapeutiques. Ed Masson, Paris, **2003**

Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Lesèche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **2000**; 101 : 2450 – 2453

Tsimikas S, Palinski W, Halpern SE, Yeung DW, Curtiss LK, Witztum JL. Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions *in vivo*. *J Nucl Cardiol* **1999**; 6 : 41 – 53

Tsimikas S. Noninvasive imaging of oxidized low density lipoprotein in atherosclerotic plaque with tagged oxidation-specific antibodies. *Am J Cardiol* **2002**; 90(Suppl) : 22L - 27L

Uccelli L, Bolzati C, Comazzi V, Duatti A, Pasqualini R, Giganti M, Piffanelli A. Subcellular distribution of bis(dithiocarbamate) nitrido Tc(V) radiopharmaceuticals in myocardium cells of male rats. *J Nucl Med* **1992**; 33 : 850 (Abstract)

Uccelli L, Pasqualini R, Duatti A, Giganti M, Piffanelli A. Uptake mechanism of the neutral myocardial imaging agent Tc-99mN-NOET. *J Nucl Med* **1993**; 34 : 18P - 19P (Abstract)

Uccelli L, Giganti M, Duatti A, Bolzati C, Pasqualini R, Cittanti C, Colamussi P, Piffanelli A. Subcellular distribution of technetium-99m-TcN-NOET in rat myocardium. *J Nucl Med* **1995**; 36 : 2075 – 2079

Urquhart J, Patterson RE, Bacharach SL, Green MV, Speir EH, Aamodt R, Epstein SE. Comparative effects of verapamil, diltiazem, and nifedipine on hemodynamics and left ventricular function during acute myocardial ischemia in dogs. *Circulation* **1984** ; 69 : 382 – 390

Vallabhajosula S, Fuster V. Atherosclerosis : imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine. *J Nucl Med* **1997**; 38 : 1788 – 1796

Vanzetto G, Calnon DA, Ruiz M, Watson DD, Pasqualini R, Beller GA, Glover DK. Myocardial uptake and redistribution of ^{99m}Tc -N-NOET in dogs with either sustained coronary low flow or transient coronary occlusion - comparison with ²⁰¹Tl and myocardial blood flow. *Circulation* **1997**; 96 : 2325 – 2331

Vanzetto G, Fagret D, Pasqualini R, Mathieu JP, Chossat F, Machecourt J. Biodistribution, dosimetry, and safety of myocardial perfusion imaging agent 99mTcN-NOET in healthy volunteers. *J Nucl Med* **2000**; 41 : 141 – 148

Vanzetto G, Glover DK, Ruiz M, Calnon DA, Pasqualini R, Watson DD, Beller GA. ^{99m}Tc-N-NOET myocardial uptake reflects myocardial blood flow and not viability in dogs with reperfused acute myocardial infarction. *Circulation* **2000**⁽²⁾; 101 : 2424 – 2430

Vasile E, Simionescu M, Simionescu N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium *in situ*. *J Cell Biol* **1983** 96 : 1677 – 89

Vaughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **2000**; 35 : 1 - 10

- Vaughan** CJ, Gotto AM. Update on statins: 2003. *Circulation* **2003**; 110 : 886 – 892
- Verschraagen** M, Koks C, Schellens J, Beijnen J. P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: the case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res* **1999**; 40 : 301 – 306
- Walsh** MN, Geltman EM, Steele RL, Kenzora JL, Ludbrook PA, Sobel BE, Bergmann SR. Augmented myocardial perfusion reserve after coronary angioplasty quantified by positron emission tomography with H₂(15)O. *J Am Coll Cardiol* **1990**; 15 : 119 – 127
- Wang** J, Geng YJ, Guo B, Klima T, Lal BN, Willerson JT, Casscells W. Near-infrared spectroscopic characterization of human advanced atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* **2002**; 39 : 1305 – 1313
- Weich** HF, Strauss HW, Pitt B. The extraction of thallium-201 by the myocardium. *Circulation* **1977**⁽²⁾; 56 : 188 – 191
- Weich** HW, Strauss HW, D'Agostino R, Pitt B. Determination of extraction fraction by a double-tracer method. *J Nucl Med* **1977**; 18 : 226 - 230
- Weinbaum** S, Chien S. Lipid transport aspects of atherogenesis. *J Biomech Eng* **1993** ; 115 : 602 - 10
- Weinbaum** S, Tzeghai G, Ganatos P, Pfeffer R, Chien S. Effect of cell turnover and leaky junctions on arterial macromolecular transport. *Am J Physio.* **1985** 248 : H945 - 60
- Whalen** DA, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I. Effects on cell volume regulation. *Am J Pathol* **1974**; 74 : 381 – 397
- Wiklund** O, Carew TE, Steinberg D. Role of the low density lipoprotein receptor in penetration of low density lipoprotein into rabbit aortic wall. *Arteriosclerosis* **1985**; 5 : 135 – 141
- Williams** BR, Mullani NA, Jansen DE, Anderson BA. A retrospective study of the diagnostic accuracy of a community hospital-based PET center for the detection of coronary artery disease using rutherfordium-82. *J Nucl Med* **1994**; 35 : 1586 – 1592
- Wilson** RA, Shea M, Landsheere CD, Deanfield J, Lammertsma AA, Jones T, Selwyn AP. Rubidium-82 myocardial uptake and extraction after transient ischemia : PET characteristics. *J Comput Assist Tomogr* **1987**; 11 : 60 – 66
- Wilson** PWF, D'agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **1998**; 97 : 1837 – 1847
- Winter** PM, Morawski AM, Caruthers SD, Fuhrhop RW, Zhang H, Williams TA, Allen JS, Lacy EK, Robertson JD, Lanza GM, Wickline SA. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha_v\beta_3$ -integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* **2003**; 108 : 2270 – 2274
- Worthylake** RA, Burridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Op Cel Biol* **2001**; 13 : 569 – 577

Wu KC, Zerhouni EA, Judd RM, Lugo-Olivieri CH, Barouch LA, Schulman SP, Blumenthal RS, Lima JA. Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 1998; 97 : 765 – 772

Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz T, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Kang DH, Halpern EF, Tearney GJ. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation* **2002** ; 106 : 1640 – 1645

Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, defense and disorders of the central nervous systems. *Cell Mol Life Sci* **1998**; 54 : 628 – 640

Yamamoto T, Bishop RW, Brown MS, Goldstein JL, Russel DW. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* **1986**; 232 : 1230 – 1237

Yamamoto Y, de Silva R, Rhodes CG, Araujo LI, Iida H, Rechavia E, Nihoyannopoulos P, Hackett D, Galassi AR, Taylor CJ, et al. A new strategy for the assesment of viable myocardium and regional myocardial blood flow using 15O-water and dynamic positron emission tomography. *Circulation* **1992**; 86 : 167 – 178

Yokohama I, Ohtake T, Momomura SI, Yonekura K, Nishikawa J, Sasaki Y, Omata M. Impaired myocardial vasodilation during hyperemic stress with dipyridamole in hypertriglyceridemia. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 31 : 1568 – 1574

Yoshinaga K, Katoh C, Noriyasu K, Iwado Y, Furuyama H, Ito Y, Kuge Y, Kohya T, Kitabatake A, Tamaki N. Reduction of coronary flow reserve in areas with and without ischemia on stress perfusion imaging in patients with coronary artery disease: a study using oxygen 15-labeled water PET. *J Nucl Cardiol* **2003** ; 10 : 275 – 283

Younès A, Songadele JA, Maublant J, Platts E, Pickett R, Veyre A. Mechanism of uptake of technetium-tetrofosmin. II: uptake into isolated adult rat heart mitochondria. *J Nucl Cardiol* **1995**; 2 : 327 – 333

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanan F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng Liu. Effect of potential modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study) : case-control study. *Lancet* **2004**; 364 : 937 – 952

Zarrabi A, Gul K, Willerson JT, Casscells W, Naghavi M. Intravascular thermography: a novel approach for detection of vulnerable plaque. *Curr Op Cardiol* **2002**; 17 : 656 – 662

Zimmerman-Paul GG, Quick HH, Vogt P, Von Schulthess G, Kling D, Debatin JF. High resolution intravascular magnetic resonance imaging. Monitoring of plaque formation in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **1999**; 99 : 1054 - 1061

Médecine nucléaire et maladie coronarienne : évaluation de traceurs de la perfusion myocardique et de la plaque d'athérome vulnérable.

La maladie coronarienne représente l'une des premières causes de mortalité dans le monde. La médecine nucléaire constitue la principale modalité d'imagerie pour le diagnostic et la prise en charge de cette pathologie.

Perfusion : Actuellement, les radiotraceurs utilisés en pratique clinique sont des traceurs de la perfusion myocardique. Le thallium-201, traceur de référence, présente une dosimétrie élevée. $^{99m}\text{TcN-NOET}$ a été proposé pour son remplacement. Contrairement aux résultats précédemment obtenus *in vitro* sur des cardiomyocytes, le vérapamil, un inhibiteur calcique, n'inhibe pas la fixation myocardique de $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* chez le chien. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une fixation endothéliale de ce traceur. D'autre part, les études indiquent qu'en tant que traceur pur du débit, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ peut être utilisé pour apprécier la viabilité tissulaire myocardique sur un modèle d'infarctus chronique du myocarde chez le rat.

Athérome : La rupture d'une plaque d'athérome vulnérable est l'évènement responsable de la majorité des accidents coronariens. La seconde partie de cette thèse porte sur l'évaluation de nouveaux radiotraceurs potentiels de ces plaques sur un modèle expérimental de lapin génétiquement hypercholestérolémique. Les 4 traceurs évalués (B2702(R), B2702-I, B2702-Tc et Tc-RAFT-B2702) sont dérivés d'un peptide issu d'une molécule de CMH-I décrit pour lier VCAM-1, une molécule d'adhésion exprimée au niveau des plaques vulnérables. Les études autoradiographiques indiquent que les 4 traceurs s'accumulent dans les plaques d'athérome exprimant VCAM-1 et que c'est I-B2702 qui présente le meilleur rapport de fixation plaque/région saine.

Nuclear Medicine and coronary artery disease: evaluation of tracers of myocardial perfusion and vulnerable atherosclerotic plaque.

Coronary artery disease is one of the primary cause of mortality worldwide. Nuclear Medicine is the major imaging technique for diagnosis and following of this disease.

Perfusion : Nowadays, major radioactive agents used in clinical practice are myocardial perfusion tracers. The reference tracer is thallium-201. However, ^{201}Tl presents some drawbacks. $^{99m}\text{TcN-NOET}$ has been proposed for its replacement. This study shows that in contrast with previous studies realized *in vitro* on cardiomyocytes, verapamil, an L-type calcium channel inhibitor, does not inhibit myocardial fixation of $^{99m}\text{TcN-NOET}$ *in vivo* in dog. This data is in agreement with the hypothesis of a non specific endothelial fixation of this tracer. Moreover, this study shows that as a pure tracer of myocardial perfusion, $^{99m}\text{TcN-NOET}$ can also be used to assess myocardial viability on a model of myocardial chronic infarctus in rat.

Atherosclerosis : Disruption of vulnerable atherosclerotic plaques is the main event leading to coronary accidents. The second part of this study concerns the evaluation of new potential tracers of the vulnerable atherosclerotic plaque in an experimental model of rabbit with an inheritable hypercholesterolemia. The four tracers evaluated (B2702(R), B2702-I, B2702-Tc and Tc-RAFT-B2702) are synthetic peptides comprising the residues 75-84 of HLA-B2702, a molecule known to link VCAM-1, an adhesion molecule expressed in vulnerable atherosclerotic plaque. The autoradiography studies show that all tracers accumulate within atherosclerotic plaque expressing VCAM- and that. I-B2702 shows the best plaque/control fixation ratio.

Mots clés : Médecine Nucléaire, Perfusion myocardique, athérosclérose, B2702, $^{99m}\text{TcN-NOET}$.