



**HAL**  
open science

# Quantification non invasive de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde par analyse markovienne en imagerie nucléaire SPECT

Guillaume Pons

► **To cite this version:**

Guillaume Pons. Quantification non invasive de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde par analyse markovienne en imagerie nucléaire SPECT. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENS008 . tel-00601821

**HAL Id: tel-00601821**

**<https://theses.hal.science/tel-00601821>**

Submitted on 20 Jun 2011

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie  
pour la Médecine, la Biologie et l'Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Guillaume PONS**

Thèse dirigée par **Laurent RIOU**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques  
Biocliniques – INSERM U1039**

dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition  
et l'Environnement**

## Quantification non invasive de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde par analyse markovienne en imagerie nucléaire SPECT

Thèse soutenue publiquement le **28 avril 2011**,  
devant le jury composé de :

**Mr Philippe FRANKEN**

PU-PH CHU de Nice, Rapporteur

**Mr Jean Eric WOLF**

PU-PH CHU de Dijon, Rapporteur

**Mr Jacques BONNET**

PU-PH CHU de Bordeaux, Membre

**Mr Daniel FAGRET**

PU-PH CHU de Grenoble, Président

**Mr Laurent RIOU**

CR INSERM Grenoble, Membre

**Mr Gérald VANZETTO**

PU-PH CHU de Grenoble, Membre



## *Remerciements*

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma gratitude

Aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail,

Au Professeur Daniel Fagret pour son accueil au sein du laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques, et pour avoir été à l'initiative de cette étude,

Au Docteur Laurent Riou pour ses compétences, sa disponibilité, et son aide précieuse,

A l'ensemble des personnes qui ont été indispensables à la réalisation de ce travail,

A Eric Pellegrini et Nils Johnson pour leur précieuse collaboration en programmation,

A Lotfi Slimani, Gérald Vanzetto, et Alix Martin,

A Jean-Cyril Bourre, Alex Calizzano, Jean-Pierre Caravel, et à l'ensemble du service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble,

A Marie-Dominique Desruet et à l'ensemble du laboratoire de radiopharmacie du CHU de Grenoble,

A Marie-Claire Toufektsian et Carole Schwebel pour leur aide en échocardiographie,

A Alexei Grichine pour son accueil à l'IAB,

A l'ensemble du laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques,

A Mitra Ahmadi, Catherine Arnaud, René Bontron, Aurélie Bozon, Arnaud Briat, Alexis Broisat, Elsa Cleyssac, Julien Dimastromatteo, Dominique Garin, Catherine Ghezzi, Stéphanie Guillermet, Marion Henri, Danièle Marti-Battle, Sandrine Martin, Jean-Paul Mathieu, Pascale Perret, Lucie Sancey, Jakub Toczec et Julien Vollaire, pour leur disponibilité et leur aide, leur écoute, leur soutien et leurs conseils, et pour leur bonne humeur,

A mes parents, mes deux chers frères, et l'ensemble de mes proches,

A Nico pour sa compréhension, son soutien, sa patience, son écoute et sa confiance.

# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	7
<b>Introduction Générale</b> .....	8
<b>Première partie : Revue bibliographique</b> .....	11
<b>1 Endothélium et microcirculation</b> .....	12
1.1 Physiologie .....	12
1.1.1 Structure des artères et microcirculation coronaire .....	12
1.1.2 Endothélium .....	14
1.1.3 Vasodilatateurs .....	14
1.1.3.1 Le monoxyde d’azote .....	14
1.1.3.2 La Prostacycline .....	18
1.1.3.3 Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l’endothélium.....	19
1.1.4 Vasoconstricteurs .....	20
1.1.4.1 L’endothéline-1 .....	20
1.1.4.2 Les radicaux libres dérivés de l’oxygène .....	21
1.1.4.3 Les prostanoïdes vasoconstricteurs .....	23
1.1.5 Effets de l’insuline sur l’endothélium .....	24
1.1.6 Conclusion sur la physiologie de la fonction endothéliale.....	26
1.2 La dysfonction endothéliale et les risques cardiovasculaires .....	27
1.2.1 La dysfonction endothéliale .....	27
1.2.2 Dysfonction endothéliale et facteurs de risque cardiovasculaire .....	28
1.2.2.1 Le tabagisme.....	28

1.2.2.2	La dyslipidémie .....	29
1.2.2.3	L'obésité .....	31
1.2.2.4	L'hypertension.....	32
1.2.2.5	Le diabète .....	34
1.2.2.6	L'athérosclérose.....	40
1.2.3	Conclusion sur la dysfonction endothéliale .....	42
<b>2</b>	<b>Mesure de la dysfonction endothéliale et des altérations de la perfusion du myocarde .....</b>	<b>43</b>
2.1	Mesure de la dysfonction endothéliale .....	43
2.1.1	Mesure invasive de la dysfonction endothéliale .....	43
2.1.2	Mesure non invasive de la dysfonction endothéliale : Flow Mediated Vasodilatation .....	45
2.2	Mesure non invasive de la perfusion du myocarde .....	48
2.2.1	Imagerie de la perfusion du myocarde par résonance magnétique .....	48
2.2.2	Echocardiographie de contraste .....	51
2.2.3	Mesure de la perfusion du myocarde en médecine nucléaire.....	53
2.2.3.1	Principaux traceurs radioactifs du débit sanguin coronaire utilisés dans l'étude la maladie coronaire .....	54
2.2.3.1.1	Thallium 201 .....	54
2.2.3.1.2	Technétium-MIBI .....	57
2.2.3.1.3	Rubidium 82.....	59
2.3	Conclusion sur les mesures de la dysfonction endothéliale et des altérations de la perfusion du myocarde .....	60
<b>3</b>	<b>Hétérogénéité de la perfusion du myocarde .....</b>	<b>62</b>
3.1	Hétérogénéité physiologique de la perfusion du myocarde.....	62
3.2	Mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde .....	63
3.2.1	Analyse fractale.....	63

3.2.2	Analyse markovienne .....	65
3.3	Conclusion sur l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.....	66
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>68</b>
<b>Seconde partie : Travail expérimental .....</b>		<b>69</b>
<b>1</b>	<b>Etude clinique.....</b>	<b>70</b>
1.1	Etude clinique de l'influence du filtre sur l'analyse markovienne de la perfusion du myocarde en imagerie SPECT.....	71
1.1.1	Introduction .....	71
1.1.2	Méthode.....	71
1.1.2.1	Sélection de la population.....	71
1.1.2.2	Protocole d'imagerie SPECT.....	72
1.1.2.3	Analyse des images .....	72
1.1.2.4	Analyses statistiques.....	76
1.1.3	Résultats .....	76
1.1.3.1	Facteurs de risque .....	76
1.1.3.2	Index d'hétérogénéité .....	77
1.1.4	Discussion .....	81
1.1.5	Conclusion sur l'étude clinique de l'influence du filtre sur l'analyse markovienne de la perfusion du myocarde en imagerie SPECT .....	82
1.2	Etude clinique rétrospective .....	83
1.2.1	Introduction .....	83
1.2.2	Méthode.....	83
1.2.2.1	Sélection de la population.....	83
1.2.2.2	Protocole d'imagerie SPECT.....	84
1.2.2.3	Analyse des images .....	85

1.2.2.4	Analyses statistiques .....	87
1.2.3	Résultats .....	88
1.2.3.1	Facteurs de risque .....	88
1.2.3.2	Index d'hétérogénéité .....	89
1.2.3.3	Gradient longitudinal de perfusion .....	91
1.2.4	Discussion .....	93
1.2.5	Conclusion sur l'étude clinique rétrospective .....	95
<b>2</b>	<b>Etude expérimentale .....</b>	<b>96</b>
2.1	Etude méthodologique .....	97
2.1.1	Etude comparative de deux méthodes d'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde .....	97
2.1.1.1	Introduction .....	97
2.1.1.2	Méthode .....	97
2.1.1.2.1	Population étudiée .....	97
2.1.1.2.2	Protocole d'imagerie SPECT .....	98
2.1.1.2.3	Analyse des images .....	98
2.1.1.2.4	Analyses statistiques .....	101
2.1.1.3	Résultats.....	102
2.1.1.4	Discussion.....	104
2.1.1.5	Conclusion .....	104
2.1.2	Evaluation de l'impact de l'activité du radiotracer sur l'index H .....	105
2.1.2.1	Introduction .....	105
2.1.2.2	Méthode .....	105
2.1.2.3	Résultats.....	106
2.1.2.3.1	Résultats obtenus avec le $^{201}\text{Tl}$ .....	106
2.1.2.3.2	Résultats obtenus avec le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	107

2.1.2.3.3	Résultats obtenus avec le $^{18}\text{F}$ .....	108
2.1.2.4	Discussion.....	110
2.1.2.5	Conclusion .....	112
2.2	Etude physiopathologique .....	113
2.2.1	Introduction .....	113
2.2.2	Méthode.....	113
2.2.2.1	Animaux .....	113
2.2.2.1.1	Modèle de diabète de type 1 .....	113
2.2.2.1.2	Modèle de diabète de type 2 .....	115
2.2.2.2	Radiotraceurs utilisés.....	115
2.2.2.2.1	$^{201}\text{Tl}$ (Thallium).....	115
2.2.2.2.2	Marquage du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI) .....	116
2.2.2.3	Imagerie in vivo.....	116
2.2.2.3.1	Modèle de diabète de type1 .....	116
2.2.2.3.2	Modèle de diabète de type2 .....	117
2.2.2.4	Etude ex vivo .....	118
2.2.2.5	Analyse des images .....	119
2.2.2.5.1	Images scintigraphiques.....	119
2.2.2.5.2	Echocardiographie .....	120
2.2.2.5.3	Histologie et immunohistologie.....	120
2.2.2.6	Analyses statistiques.....	121
2.2.3	Résultats obtenus avec le modèle de diabète de type 1 .....	121
2.2.3.1	Paramètres généraux.....	121
2.2.3.2	Morphologie et fonction du ventricule gauche par échocardiographie .....	123
2.2.3.3	Fibrose .....	124
2.2.3.4	Densité capillaire .....	125
2.2.3.5	Imagerie scintigraphique et index d'hétérogénéité.....	126



2.2.4	Résultats obtenus avec le modèle de diabète de type 2.....	128
2.2.4.1	Paramètres généraux.....	128
2.2.4.2	Morphologie et fonction du ventricule gauche par échocardiographie .....	131
2.2.4.3	Fibrose .....	132
2.2.4.4	Densité capillaire .....	133
2.2.4.5	Index d'hétérogénéité .....	134
2.2.5	Discussion .....	136
2.2.6	Limites de la méthode .....	141
2.2.7	Conclusion et perspectives .....	141
	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>143</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>144</b>

## Liste des abbréviations

ADMA : Diméthylarginine asymétrique	LGA : Gradient longitudinal de la perfusion du myocarde
AGEs : Produits de glycation avancée	MIBI : Sestamibi
BH4 : Tétrahydrobioptérine	NO : Monoxyde d'azote
CAD : Cardiopathie coronarienne	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> : Anion superoxyde
COX : Cyclooxygénase	PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
CTRL : Contrôle	PET : Tomographie par émission de positons
D : Dimension fractale	PGI <sub>2</sub> : Prostacycline ou Prostaglandine I <sub>2</sub>
DAG : Diacyglycérol	PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
ECG : Electrocardiogramme	PKG : Protéine kinase GMPc-dépendante
ECM : Echographie de contraste du myocarde	PKC : Protéine kinase C
EDHF : Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium	PLC: Phospholipase C
eNOS : NO synthase endothéliale	Rb : Rubidium
ET-1 : Endothéline-1	RAGEs : Récepteur des AGEs
F : Fluore	RD : Dispersion relative
FAD : Flavine adénine dinucléotide	ROS : Radicaux libres dérivés de l'oxygène
FMD : Vasodilatation induite par le flux	SCA : Syndrome coronarien aigu
FMN : Flavine adénine mononucléotide	SPECT : Tomographie par émission monophotonique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène	STZ : Streptozotocine
HDL : Lipoprotéines de haute densité	Tc : Technétium
HI ou index H : Index d'hétérogénéité	Tl : Thallium
IL-1 : Interleukine 1	TP : Récepteur endoperoxyde/thromboxane
IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate	VG : Ventricule gauche
IRM : Imagerie par résonance magnétique	
IRS : Substrats du récepteur à l'insuline	
LDL : Lipoprotéines de faible densité	

## Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, et un tiers de ces décès sont causés par la maladie coronarienne. La plaque d'athérome coronarienne est ainsi la cause la plus fréquente des cardiopathies ischémiques, et la rupture de cette plaque suivie d'une thrombose est la principale cause d'un syndrome coronarien aigu (SCA), pouvant induire un infarctus du myocarde et la mort subite. La composition et la vulnérabilité de la plaque d'athérome, plutôt que son volume et la sévérité de la sténose induite, sont apparues comme les facteurs les plus importants pour le développement d'un SCA causé par un thrombus. Les plaques riches en lipides et fragiles sont en effet plus dangereuses que celles riches en collagène et rigides parce qu'elles sont instables, sujettes à la rupture, et très thrombogènes. Jusqu'ici, malgré des recherches approfondies, un facteur de risque prédictif fiable de ces événements vasculaires aigus sur une base individuelle n'a pas réussi à émerger. L'étude de la fonction endothéliale pourrait cependant apporter des informations essentielles sur le développement de la plaque d'athérosclérose.

En effet, l'endothélium joue un rôle essentiel dans l'homéostasie vasculaire en sécrétant des substances à la fois pour la régulation du tonus vasculaire, de l'activité des plaquettes et des facteurs de coagulation, et influence l'inflammation vasculaire, la migration et la prolifération cellulaire (Falk 1995). Les patients ayant une cardiopathie coronarienne (CAD) et des facteurs de risque présentent généralement une dysfonction endothéliale. La caractéristique de la dysfonction est une vasoconstriction modérée hétérogène des artères coronaires de l'épicarde et de la microcirculation. Par conséquent, la fonction endothéliale, qui reflète l'impact global de ces multiples facteurs génétiques et environnementaux sur le système vasculaire, pourrait servir comme un outil diagnostique et pronostique utile. En effet, tel que démontré par Halcox et coll., la dysfonction endothéliale coronaire épiscopale et microvasculaire évaluée de façon invasive par angiographie prédit de façon indépendante à moyen terme des événements cardiaques aigus (Halcox 2002). La dysfonction endothéliale est donc un phénomène précoce qui pourrait être utilisé pour identifier l'athérosclérose bien avant le développement de la plaque, et la mise en place d'une technique d'analyse non invasive serait d'un grand intérêt en routine clinique.

Chez des patients à haut risque, le débit coronaire au repos mesuré en imagerie PET chute de  $\pm 20\%$  suite à l'inhibition de la production du monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales des artères coronaires, sans réduction significative du débit sanguin coronaire maximum ou de la réserve coronaire (Loscalzo 1994, Quyyumi 1995, Schachinger 1995, Shiode 1996), reflétant ainsi une fonction microvasculaire altérée au repos. Il a été démontré que la tomographie par émission de positons (PET) est en mesure de mettre en évidence l'hétérogénéité de la fonction endothéliale coronaire chez ces sujets à haut risque (el-Tamimi 1994, Kuo 1995, Penny 1995, Johnson 2005). En conséquence, LK. Gould et N. Johnson ont émis l'hypothèse qu'une hétérogénéité de la perfusion du myocarde observée visuellement au repos pourrait être une manifestation de la dysfonction endothéliale de la microcirculation coronaire, et serait le reflet d'une vasoconstriction hétérogène des artères coronaires, provoquée par l'altération des voies de signalisation impliquant les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs dérivés de l'endothélium (Gould 1999). Il est d'un grand intérêt clinique de confirmer cette hypothèse, la dysfonction endothéliale étant associée à des CAD précliniques (Bugiardini 2004) et à de potentiels SCA tardifs (Suwaidi 2000, Schachinger 2000). La mise en évidence de l'hétérogénéité de perfusion du myocarde pourrait donc fournir la base d'un traitement préventif intensif. Il a été démontré que cette hétérogénéité de la perfusion du myocarde serait apparemment quantifiable en imagerie PET, mais l'impact pronostique reste encore inconnu. De plus, jusqu'à présent, aucune donnée n'est disponible quant à la capacité de mettre en évidence et de quantifier cette hétérogénéité de perfusion du myocarde par l'utilisation de la scintigraphie de perfusion du myocarde en imagerie par tomographie par émission monophotonique (SPECT). Un outil développé pour cet usage serait particulièrement pratique puisqu'il ne nécessiterait pas de nouveau protocole pour le patient, et il apporterait un nouvel indice sur une étude réalisée en routine clinique. Par ailleurs, l'adaptation de cet outil aux études expérimentales sur le petit animal pourrait fournir en évaluant l'état de la fonction endothéliale un indice supplémentaire applicable à de nombreuses études physiopathologiques.

En conséquence, deux études ont fait l'objet de ce travail :

1. Une étude clinique visant à déterminer la faisabilité de la quantification de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde en imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  chez des patients diabétiques par rapport à des sujets avec un faible niveau de facteurs de risque cardiovasculaire et une faible probabilité de maladie coronarienne.

2. Une étude expérimentale chez deux modèles animaux de diabète visant à tester l'hypothèse que l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde pourrait être quantifiée en imagerie du petit animal SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  et/ou au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, et serait en corrélation avec des altérations histologiques résultant d'une dysfonction endothéliale (comme la raréfaction capillaire et la fibrose du myocarde observées dans la cardiomyopathie diabétique).

## **Première partie : Revue bibliographique**

# 1 Endothélium et microcirculation

## 1.1 Physiologie

### 1.1.1 Structure des artères et microcirculation coronaire

La paroi des artères est constituée de trois couches ou tuniques morphologiquement distinctes, séparées par des lames d'élastine, de la lumière à la périphérie : l'intima, la limitante élastique interne, la média, la limitante élastique externe, et l'adventice. L'intima, aussi appelée endothélium, est la couche la plus interne, directement en contact avec la lumière des vaisseaux et le sang. Elle est composée d'une unique couche des cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif, la lame basale. L'intima a un rôle très important dans la modulation de la vasomotricité des artères et possède aussi un rôle antithrombotique et fibrinolytique. La plaque d'athérome débute sa formation dans l'espace sous-endothélial. La média est la couche la plus épaisse de la paroi des artères, composée principalement de cellules musculaires lisses et d'une matrice extracellulaire constituée de fibres d'élastine et de collagène. On peut noter des différences entre les vaisseaux ayant un diamètre interne plus petit et ceux ayant un diamètre plus grand que 100 à 150  $\mu\text{m}$ . Les artérioles, ayant un diamètre interne plus petit que 100 à 150  $\mu\text{m}$ , ne possèdent qu'une à quatre couches de cellules musculaires lisses, alors que les petites artères, ayant un diamètre interne plus grand que 100 à 150  $\mu\text{m}$ , possèdent 4 à 6 couches de cellules musculaires lisses, aussi appelées unités lamellaires (Komaru 2000). Ces cellules musculaires lisses ont un rôle indispensable dans la contraction et la relaxation des artères. L'adventice est la couche la plus externe, constituée de tissu conjonctif riche en collagène et en élastine, et contenant des fibroblastes, des macrophages, et des adipocytes. L'adventice possède des terminaisons nerveuses, plus nombreuses sur les petits vaisseaux, et l'apport d'oxygène et de nutriments se fait par les vasa vasorum, plus nombreux sur les vaisseaux de plus gros calibre.

Les artères coronaires peuvent être classées en trois grands groupes suivant leurs fonctions et leur morphologie. Les artères avec un diamètre interne supérieur à 400  $\mu\text{m}$  sont situées dans l'épicarde, et offrent peu de résistance au flux sanguin. Elles ont comme fonction principale

de conduire le sang. Elles participent à moins de 5 à 10 % des résistances coronaires, et il faut une diminution de leur diamètre d'au moins 50 à 70 % pour induire une diminution de pression en aval de la sténose. Les petites artères avec un diamètre interne compris entre 100 et 400  $\mu\text{m}$  possèdent un tonus vasomoteur, mais ne sont pas soumises à un contrôle métabolique direct. Elles participent pour 25 à 40 % des résistances. Ces préartérioles maintiennent la pression à l'origine des artérioles. Les artérioles avec un diamètre interne inférieur à 100  $\mu\text{m}$  permettent les échanges nutritifs. Elles sont sensibles aux besoins métaboliques et sont le site des résistances les plus importantes. C'est en effet au niveau de ces artérioles que s'effectuent la vasodilatation métabolique et l'autorégulation.

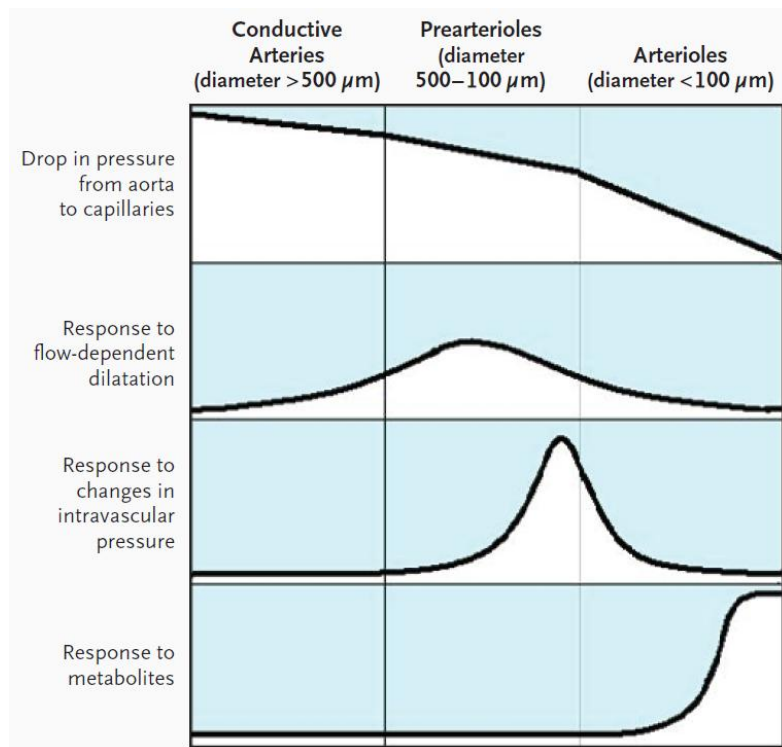


Figure 1 : Anatomie fonctionnelle du système artériel coronaire (Camici 2007).

Cependant, il est difficile de situer ce qui est désigné comme étant la microcirculation coronaire parmi ces segments vasculaires, et on observe un manque d'uniformité dans sa définition et sa limitation. Il n'y a pas de démarcation abrupte, la transition entre les différents segments se fait graduellement, et les caractéristiques structurales ne suffisent donc pas. La fonction de la microcirculation est d'adapter l'apport en oxygène et en nutriment, et d'éviter les changements importants de la pression hydrostatique au niveau des capillaires. Le diamètre interne maximal de la microcirculation coronaire se situerait ainsi entre 150 et 300  $\mu\text{m}$  (Duncker 2000, Komaru 2000, Camici 2007, Serné 2007).



## **1.1.2 Endothélium**

L'endothélium est le plus grand organe endocrine du corps, avec une surface estimée aux alentours de 700 m<sup>2</sup> et un poids allant de 1 à 1.5 kg pour une personne de 70 kg (Korkmaz 2008). L'endothélium est un épithélium pavimenteux simple, composé d'une couche unique de cellules aplaties et polarisées. Il tapisse l'intérieur des cavités de tous les vaisseaux sanguins, et sa surface lisse permet de limiter les frottements. On peut remarquer que les capillaires sont uniquement composés de cellules endothéliales. L'endothélium n'est pas seulement une barrière passive. Il joue un rôle essentiel et central dans la régulation du débit sanguin, comme l'ont montré pour la première fois Furchott et Zawadzki en 1980 (Furchott et Zawadzki, 1980). En effet, l'endothélium maintient l'homéostasie vasculaire par différentes fonctions qui sont le contrôle de la vasomotricité vasculaire par la sécrétion de vasodilatateurs et de vasoconstricteurs, le maintien de la barrière semi-perméable qui régule le passage de substances de la circulation aux tissus périphériques, la synthèse et la libération de différentes cytokines et facteurs de croissance, le renouvellement et l'oxydation des lipoprotéines des parois artérielles, l'apport d'une surface non thrombogène pour les leukocytes et les plaquettes, et enfin le maintien du collagène et des protéoglycanes dans la structure de la lame basale qui favorise autrement l'agrégation des thrombocytes (Vanhoutte 1982, Moncada 1991, Schini 1994, Fleming 1995)

## **1.1.3 Vasodilatateurs**

### ***1.1.3.1 Le monoxyde d'azote***

Le monoxyde d'azote (NO) est un puissant vasodilatateur de courte demi-vie. C'est la substance diffusible la plus importante dans la vasodilatation endothélium-dépendante des cellules musculaires lisses des vaisseaux, sécrétée en réponse à l'acétylcholine comme décrit pour la première fois par Furchgott et Zawadzki en 1980 (Furchgott et Zawadzki 1980), et qui fut initialement appelée EDRF pour « endothelium-derived relaxing factor ». Un grand nombre de stimuli physiologiques peuvent provoquer la formation de NO, dont l'acétylcholine, le stress de cisaillement, des hormones circulantes (catécholamines,

vasopressines, aldostérone), des produits des plaquettes (sérotonine, ADP), des autacoïdes (histamine, bradykinine), ou encore la thrombine (Lüscher 1990, Vanhoutte 2009a).

Les cellules endothéliales expriment de façon constitutive l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS), qui est un dimère localisé au niveau de la membrane plasmique des cavéoles (Michel 1997, Feron 1998) et de l'appareil de Golgi (Andries 1998, Gonzalez-Fernandez 2001). La protéine eNOS fonctionnelle produit du NO par oxydation à partir de la terminaison guanidine nitreurgique de la L-arginine, cette dernière étant alors transformée en L-citrulline (Palmer 1988). Son fonctionnement est NADPH-dépendant et nécessite la présence des co-facteurs tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), flavine adénine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD) (Moncada 1991, Forstermann 1994), et il est régulé par la présence du complexe calcium/calmoduline (Michel 1997) et par des états de phosphorylation/déphosphorylation sur des sites spécifiques (Fleming 1999, Fleming 2010). A l'état basal ou inactif, la protéine eNOS est située au niveau des cavéoles et est liée à la cavéoline-1 (Cav-1) qui diminue son activité. De plus, la protéine eNOS est phosphorylée par la PKC sur le résidu thréonine 495, ce qui empêche l'association avec le complexe calcium/calmoduline (Fleming 2001). En réponse à une stimulation, Cav-1 se dissocie de la eNOS. Le résidu thréonine 495 est déphosphorylé ce qui permet la liaison entre le complexe calcium/calmoduline et eNOS qui s'active alors. Cette liaison entre eNOS et le complexe calcium/calmoduline est aussi aidée par la liaison de la protéine chaperonne Hsp90 à la eNOS et la phosphorylation des sites actifs de sérine comme par exemple le site sérine 1177 par la protéine kinase A ou Akt (Gratton 2000, Mount 2007, Fleming 2010). Les électrons sont transférés au niveau du domaine réductase de la eNOS depuis la NADPH, vers la FAD puis la FMN. La calmoduline facilite le passage des électrons de la FAD vers la FMN, et du domaine réductase vers l'hème du domaine oxygénase du second monomère. La synthèse de NO se fait alors en présence de L-arginine, de BH<sub>4</sub> et d'oxygène (Stuehr 1997, Michel 2010).

La synthèse de NO est augmentée par la fixation de calcium et de calmoduline sur la eNOS (Fleming 1999). Plusieurs agonistes activent la voie de signalisation dépendante des protéines G, impliquant la protéine G<sub>q</sub> ou la protéine G<sub>i</sub> en fonction du récepteur, dont la bradykinine, la sphingosine-1-phosphate et l'acétylcholine, pour au final permettre la libération des stocks intracellulaires de calcium (Vanhoutte 2009a). Le récepteur membranaire active la phospholipase C qui clive le phosphatidylinositol 4,5-triphosphate, un composant de la membrane cellulaire, en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG est

un activateur de la protéine kinase C, et l'IP3 se lie à son récepteur spécifique qui se trouve fortement localisé au niveau des cavéoles et permet la régulation des stocks intracellulaires de calcium (Rath 2009, Vanhoutt 2009).

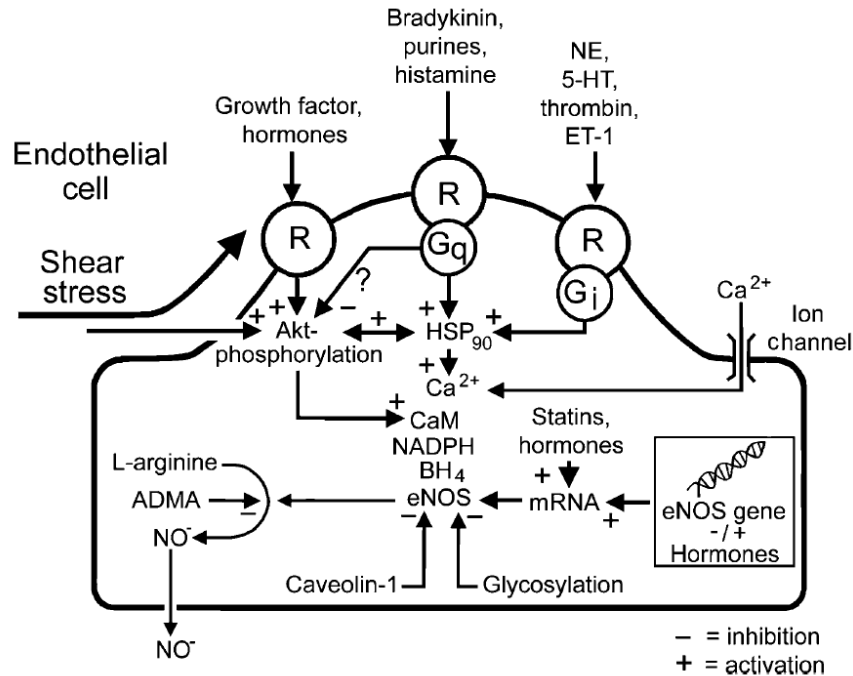


Figure 2 : Schéma des mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation de la production de NO dans la cellule endothéliale (Michel 2010).

Une augmentation du flux sanguin augmente les forces de cisaillement du sang sur les cellules endothéliales, et augmente en conséquence l'activation de la protéine eNOS par une voie dépendante de la phosphorylation et non du calcium, en passant par la phosphorylation des résidus sérine par la voie de signalisation impliquant Akt et PI3K (Fleming 2003, Jin 2003). Les cellules endothéliales exposées au stress de cisaillement ont leurs enzymes eNOS localisées au niveau des jonctions entre les cellules, où elles peuvent interagir avec PECAM-1 et la protéine adaptatrice Gab-1, pour pouvoir alors recruter des kinases comme la protéine kinase A (Ayajiki 1996).

Le NO exerce son action vasodilatatrice en agissant directement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Il diffuse librement et son action ne nécessite donc pas de récepteur de surface. Le NO stimule directement l'enzyme guanylate cyclase soluble en se fixant au niveau de son hème, ce qui va induire la formation de GMPc à partir de la guanosine triphosphate (Craven 1978, Murad 1987, Ignarro 1989). Ce mécanisme va permettre l'activation de la

protéine kinase GMPc-dépendante (PKG). La résultante de ces phénomènes est une inhibition de la machinerie contractile et une vasorelaxation des cellules musculaires lisses, mais aussi une régulation de l'agrégation des plaquettes et l'inhibition de la migration des cellules musculaires lisses (Gao 2010).

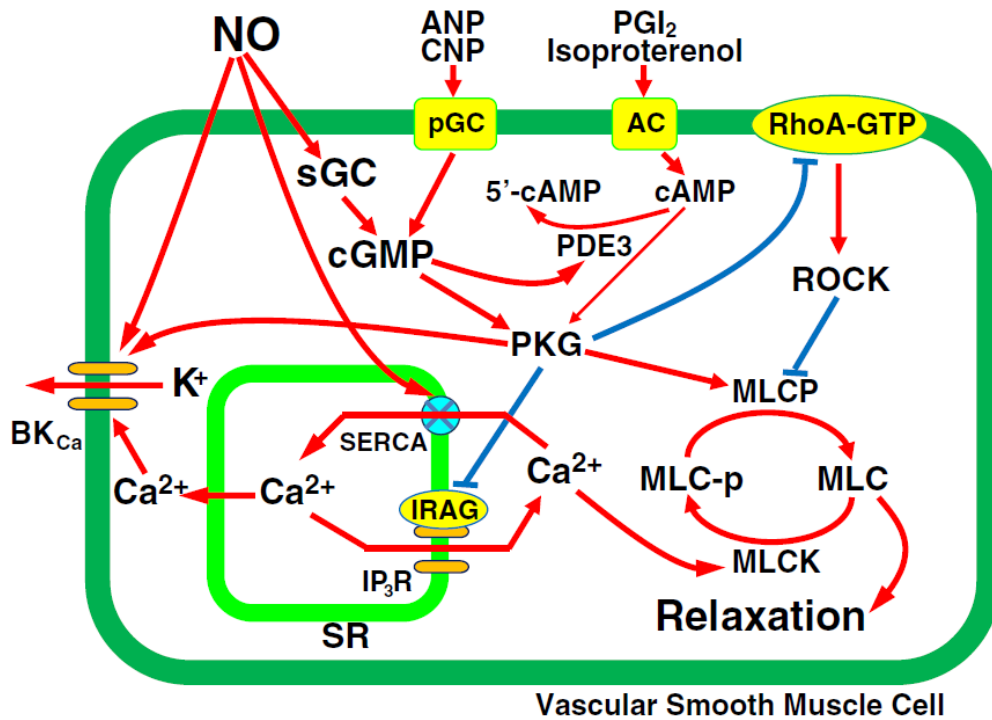


Figure 3 : Schéma des mécanismes potentiellement impliqués dans la vasodilatation de la cellule musculaire lisse induite par le NO (Gao 2010).

La relaxation des cellules musculaires lisses induite par la PKG se fait principalement par la diminution de l'entrée de calcium extracellulaire, l'inhibition de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique, et la diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium. Certains canaux potassiques peuvent aussi être activés, et conduire ainsi à une hyperpolarisation de la membrane et à une diminution de l'entrée de calcium par les canaux calciques voltage-dépendants (Gao 2010). La PKG est capable de phosphoryler les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate pour inhiber la libération de calcium par les canaux du réticulum sarcoplasmique (Gao 2010). La phosphorylation de la chaîne légère de myosine est une étape indispensable dans la contraction du muscle lisse. Des études suggèrent que la PKG est capable d'activer directement la phosphatase de la chaîne légère de myosine, ou d'interférer avec son inhibition (Ito 2004, Hofmann 2009). Le NO peut aussi agir directement sur la relaxation des vaisseaux en augmentant l'activité des canaux potassiques (Bolotina

1994), ou en stimulant la capture du calcium cytosolique par le réticulum sarcoplasmique (Adachi 2004). Le NO exerce un effet inotrope négatif sur la contractilité du myocarde, probablement en phosphorylant la troponine I par l'intermédiaire de la PKG, résultant en une désensibilisation du myofilament pour le calcium (Seddon 2007, Hofmann 2009).

Le NO lutte contre l'adhésion des monocytes et des leucocytes à l'endothélium, l'agrégation des plaquettes, la perméabilité endothéliale, et la prolifération des cellules musculaires lisses, faisant de lui le principal facteur endothélial dans la défense contre la formation des plaques d'athérome (Ross 1993).

### ***1.1.3.2 La Prostacycline***

Membre des prostanoïdes, de la famille des eïcosanoïdes, la prostacycline ou prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) fut découverte en 1976 (Bunting 1976).

La PGI<sub>2</sub> est produite dans la paroi vasculaire par les cellules endothéliales grâce à l'enzyme cyclooxygénase COX-1, ou l'enzyme inductible COX-2 dans certaines situations, en réponse au stress de cisaillement, à l'hypoxie, et à des médiateurs communs avec ceux du NO (Moncada 1979, Quadt 1982, Newby 1990). L'acide arachidonique, issu de la membrane plasmique par l'action de la phospholipase A<sub>2</sub>, est peroxydé en prostaglandine G<sub>2</sub> par l'enzyme COX-1 ou COX-2, puis est rapidement réduite en prostaglandine H<sub>2</sub> par cette même enzyme (Hecker 1989). La PGI<sub>2</sub> est enfin produite à partir de la prostaglandine H<sub>2</sub> par la prostacycline synthase.

La PGI<sub>2</sub> possède un récepteur spécifique sur la cellule musculaire lisse, indispensable pour son action (Halushka 1989, Coleman 1994). Ainsi, la PGI<sub>2</sub> ne participe pas à la vasodilatation dépendante de l'endothélium des lits vasculaires dépourvus de ce récepteur spécifique. Ce récepteur couplé à une protéine G stimule l'adénylate cyclase, dont l'action permet la production de 3',5'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Kukovetz 1979). Cette dernière provoque la sortie de calcium du cytosol des cellules musculaires lisses, une hyperpolarisation en stimulant les canaux potassiques ATP-dépendant, et enfin une inhibition de la kinase de la chaîne légère de myosine, inhibant ainsi la contraction et aidant la relaxation

(Bukoski 1989, Abe 1992, Parkington 1995). La PGI<sub>2</sub> favorise également la libération de NO par les cellules endothéliales (Shimokawa 1988). En parallèle, la GMPc inhibe la phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc. Le NO prolonge donc indirectement l'action de la PGI<sub>2</sub> (Weigert 1994, Delpy 1996).

L'action de la prostacycline reste cependant mineure et vient s'ajouter à celle du NO, qui agissent ensemble pour contrer l'agrégation plaquettaire (Lüscher 1990, Shimokawa 1996).

### ***1.1.3.3 Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium***

Les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) qui provoquent la vasodilatation endothélium-dépendante ont une origine controversée. A l'origine, le terme EDHF a été introduit en 1987 pour désigner un facteur vasodilatateur dépendant de l'endothélium, mais sans lien avec le NO ou la prostacycline (Taylor 1988, Weston 1988). Avec le temps et les différentes découvertes, il est cependant devenu un terme générique pour désigner plusieurs voies de signalisation entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La définition actuelle des EDHF insiste plus sur les différentes voies de signalisation dépendantes du calcium dans les cellules endothéliales qui conduisent à l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses. Il n'existe cependant pas à ce jour de définition exacte d'un EDHF, et sa terminologie reste donc imparfaite (Edwards 2010).

L'augmentation de calcium au sein des cellules endothéliales peut induire une relaxation dépendante de l'endothélium par hyperpolarisation des cellules musculaires lisses selon deux voies. L'importance de la voie des EDHF augmente pour les vaisseaux de faible calibre (Shimokawa 1996, Edwards 2010).

La voie classique des EDHF implique l'activation des canaux endothéliaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> conduisant à une hyperpolarisation des cellules endothéliales, qui peut être transmise aux cellules musculaires lisses par des jonctions gap, sans l'intervention d'un facteur (Edwards 1998). De plus, le potassium qui s'échappe des cellules endothéliales par ces canaux active les pompes NA/K-ATPases (Prior 1998) et les canaux K<sub>IR</sub> (Nelson 1995) sur les cellules

endothéliales et les cellules musculaires lisses, favorisant ainsi l'hyperpolarisation de ces dernières et par conséquent la vasodilatation (Hendrickx 1974, Féléto 2009).

La seconde voie de signalisation des EDHF n'implique pas l'hyperpolarisation des cellules endothéliales, mais la production dépendante du calcium d'une large variété d'EDHF, dont le NO, le HNO, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la prostacycline et les acides époxyeicosatriénoïques. Ils activent les canaux BK<sub>Ca</sub> et K<sub>ATP</sub> des cellules musculaires lisses pour permettre l'hyperpolarisation et la vasodilatation (Féléto 2009, Edwards 2010).

### **1.1.4 Vasoconstricteurs**

Un an après la révélation du Dr Furchgott du rôle essentiel de l'endothélium dans la vasodilatation, il a été clairement démontré que l'endothélium pouvait aussi être impliqué dans la vasoconstriction des artères (De Mey 1982).

#### ***1.1.4.1 L'endothéline-1***

Identifié en 1988 par Yanagisawa et coll. (Yanagisawa 1988a, Yanagisawa 1988b), ce court peptide de 21 acides aminés est le vasoconstricteur endogène le plus puissant. La sécrétion d'endothéline-1 (ET-1) est provoquée par de nombreux facteurs tels que la thrombine, l'interleukine 1, le TGF- $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'interleukine 1 (IL-1), les plaquettes, des neurohormones (arginine-vasopressine, catécholamine), la norépinephrine, l'angiotensine II, ou encore l'insuline (Kedzierski 2001, Brunner 2006, Thorin 2010). Sa synthèse est inhibée par le stress de cisaillement, l'hypoxie, la PGI<sub>2</sub> et la production basale et stimulée de NO (Boulanger 1990, Lüscher 1990). Cependant, l'ET-1 possède un fort pouvoir inhibiteur sur la relaxation induite par le NO (Ming 1998, Nguyen 1999, Thorin 1999).

Dans les cellules endothéliales, la traduction de l'ARNm correspondant produit la pré-endothéline, ou prohormone BigET. Cette dernière va être clivée tout d'abord en pro-ET-1, puis finalement en ET-1 par des enzymes de conversion de l'endothéline (ECE-1 et ECE-2)

(Thorin 2010). La production de l'ET-1 peut aussi se faire sous l'action de peptidases, indépendamment des enzymes de conversion (Yanagisawa 2000).

Des faibles concentrations d'ET-1 activent les récepteurs endothéliaux ET<sub>B</sub> couplés à la libération de NO, de PGI<sub>2</sub> et d'EDHF, provoquant ainsi une vasodilatation. Cependant, lorsque des concentrations plus élevées sont produites, ce sont les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> des cellules musculaires lisses qui sont activés pour induire une vasoconstriction (Schini 1991, Nakashima 1993). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G. L'induction de la contraction va être dépendante de l'influx de calcium extracellulaire, de la libération des stocks de calcium intracellulaire, et de l'augmentation de la sensibilité des fibres musculaires lisses au calcium (Sakurai 1992, Goto 1996, Miwa 1999, Ungvari 2000). L'ET-1 a de plus un rôle dans le remodelage vasculaire par l'augmentation du collagène et la prolifération des cellules musculaires lisses, comme réponses adaptatives dans des cas pathologiques (Sutherland 2006, Abraham 2008). Elle peut aussi provoquer l'angiogénèse, en réponse à l'hypoxie (Morbidelli 1995, Goligorsky 1999).

#### ***1.1.4.2 Les radicaux libres dérivés de l'oxygène***

En réponse au stress de cisaillement et à certains antagonistes comme la bradykinine, les cellules endothéliales produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) par la chaîne respiratoire des mitochondries, la NADPH oxydase, les enzymes COX, et la eNOS découplée (Shimizu 1994, Zalba 2000, Félétou 2006). Dans les conditions aérobies, la cellule endothéliale produit des radicaux libres dérivés de l'oxygène, comme l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ils sont générés par la respiration mitochondriale, par le transfert d'électrons sur la molécule d'oxygène et par l'activité de la NADPH oxydase (Bedard 2007, Zhang 2007, Addabbo 2009). Lorsque la quantité de substrat ou de cofacteur est insuffisante pour produire du NO, la eNOS découplée peut aussi produire l'anion superoxyde, et le peroxyde d'hydrogène (Alderton 2001, Pacher 2007).

Dans le système cardiovasculaire, les ROS sont impliqués dans des fonctions biologiques comme la régulation du tonus vasculaire (Gutterman 2005), la réponse immunitaire (Grisham



2004) et le processus d'adhésion cellulaire (Chiarugi 2003, Taddei 2007). La cascade de signalisation activée par les ROS peut impliquer les protéines kinases JNK activées par le stress et les MAP kinases. Cette voie de signalisation conduit à des oxydations réversibles affectant la régulation des gènes et la modulation de la fonction des protéines (Evans 2002, Rudich 2007).

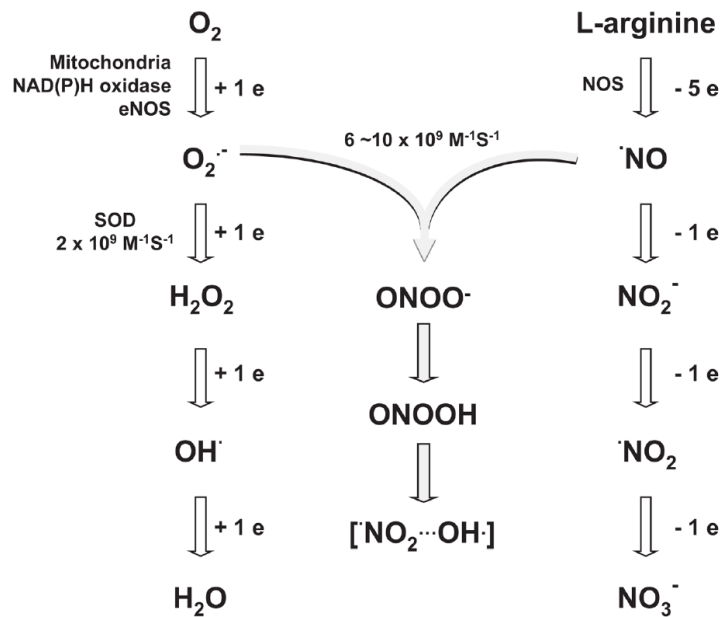


Figure 4 : Génération et élimination des ROS dans la cellule endothéliale (Xu 2009).

Les ROS peuvent inhiber les trois principaux facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium, à savoir le NO, la PGI<sub>2</sub> et l'EDHF (Félétou 2006). Ces ROS inactivent le NO, et facilitent la mobilisation du calcium et la sensibilité au calcium dans les cellules musculaires lisses, facilitant donc la vasoconstriction (Zalba 2000). Les ROS diminuent la biodisponibilité du NO en le transformant en peroxynitrite (ONOO $^{\bullet-}$ ) (Rubanyi 1986). De plus, les ROS inhibent aussi la guanylate cyclase soluble qui est la principale cible du NO (Rubanyi 1986, Price 2000, Munzel 2005). Cela résulte en une vasoconstriction des artères dans lesquelles le NO est un important médiateur de la vasodilatation qui masque les effets de médiateurs vasoconstricteurs. Ils peuvent de plus activer les cyclooxygénases pour augmenter la production de vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (Vanhoutte 2005). Enfin, l'oxydation des acides gras polyinsaturés par les ROS produit une molécule de la famille des prostaglandines, l'isoprostane, capable d'interagir avec le récepteur TP et d'induire une vasoconstriction (Morrow 1990, Yang 2004).

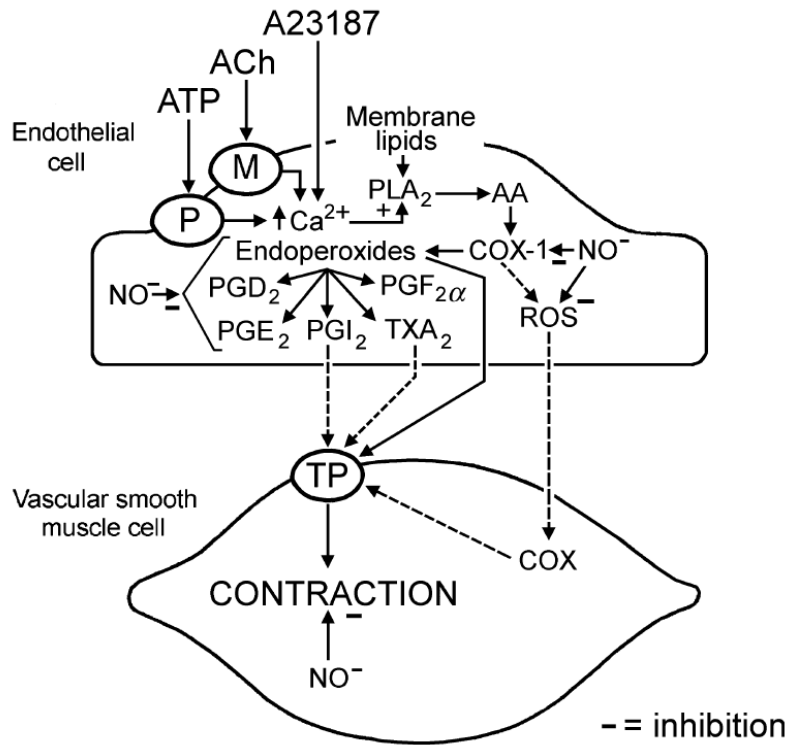


Figure 5 : Implication des ROS et des prostanoides dans la contraction dépendante de l'endothélium (Vanhoutte 2009a).

Les enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase (qui piège l' $O_2^-$  en  $H_2O_2$ ) et la catalase ou glutathion peroxydase (qui réduit  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ ) permettent d'éviter la surproduction de  $O_2^-$  et d'éviter la formation de composés dangereux par l'interaction avec les radicaux libres dérivés de l'azote (Potenza 2009). Par exemple, une réaction entre l' $O_2^-$  et le NO génère du  $ONOO^-$  qui se lie de façon irréversible, oxyde et transforme les acides nucléiques, les lipides et les protéines (Droge 2002). Le ROS  $ONOO^-$  est aussi responsable du découplage de la eNOS, de l'inhibition de la guanylate cyclase, de l'inactivation de la prostacycline synthase, et de l'inhibition des superoxydes dismutases (Munzel 2005, Zou 2004).

### 1.1.4.3 Les prostanoides vasoconstricteurs

Le métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase produit des vasoconstricteurs dépendants de l'endothélium comme la prostaglandine H2. Cette dernière est le précurseur de plusieurs prostanoides, dont la prostacycline vasodilatatrice par l'action de la prostacycline

synthase (se reporter au paragraphe 1.1.3.2), ou encore la thromboxane A2 vasoconstrictrice suite à l'action de la thromboxane synthase (Smith 1991). La production de la prostaglandine H2 et de la thromboxane A2 semble surtout se faire en réponse à l'étirement des vaisseaux suite à une augmentation de la pression sanguine, et serait alors un phénomène d'autorégulation pour revenir à un débit normal (Vanhoutte 2002).

La prostaglandine H2 et la thromboxane A2 assurent la contraction dépendante de l'endothélium par leur fixation sur un récepteur commun endoperoxyde/thromboxane (TP) à 7 domaines transmembranaires, présent sur les cellules musculaires lisses, couplé à une protéine G hétérotrimérique (Tsuboi 2002). Il va en résulter une activation de la PLC, une production d'IP3 et de DAG, puis l'ouverture de canaux calciques de la cellule musculaire lisse et la libération des stocks calciques intracellulaires, ou une inhibition de la production d'AMPC par l'adénylate cyclase pour atténuer la relaxation endothélium dépendante (Kinsella 2001). La sensibilité au calcium est aussi augmentée par la Rho-kinase. Ces prostanoides peuvent favoriser l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des cellules et l'infiltration des monocytes/macrophages (Nakahata 2008).

Cependant, la synthèse de ces prostanoides est moins importante que celle de la prostacycline, et son effet est masqué par celui des vasodilatateurs (Moncada 1979, Lüscher 1990)

### **1.1.5 Effets de l'insuline sur l'endothélium**

L'insuline contribue à la régulation hémodynamique. Elle peut avoir un rôle vasodilatateur ou vasoconstricteur, suivant la zone vasculaire et le tonus préexistant (Nystrom 1999, Saltiel 2001, Kim 2006, Potenza 2009).

La vasodilatation est l'un des effets vasculaires de l'insuline le plus important. Sa fonction vasodilatatrice est permise par la stimulation de la production de NO par l'enzyme eNOS. La fixation de l'insuline sur son récepteur endothélial active la fonction tyrosine kinase de ce dernier. Le récepteur ainsi activé phosphoryle des résidus tyrosines sur les substrats du récepteur à l'insuline (Insulin Receptor Substrate) IRS-1 et IRS-2 (Zeng 1996, Zeng 2000). L'activation de IRS-1 permet l'amarrage de molécules, et elle peut ainsi se lier

spécifiquement aux domaines SH2 de protéines adaptatrices, comme la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K. Cette liaison provoque l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K (Kim 2006). Cette activation génère des produits de lipides membranaires comme le PIP3, qui va initier une cascade de sérine/thréonine kinases, où PDK-1 est phosphorylé et activé pour phosphoryler et activer Akt (Zeng 1996, Zeng 2000). Cette dernière est capable de phosphoryler directement la eNOS sur son résidu sérine 1177, qui augmente l'activité de eNOS et donc la production de NO (Dimmeler 1999). L'activation de eNOS par l'insuline est donc indépendante et distincte de la voie de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G et le calcium (Montagnani 2001, Hartell 2005).

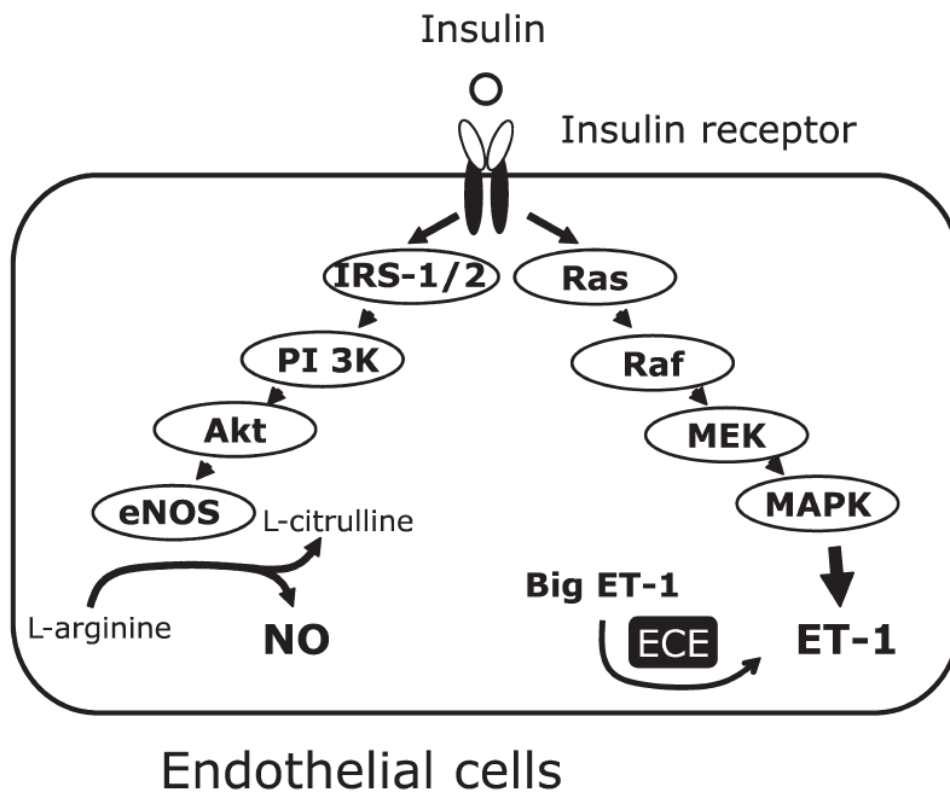


Figure 6 : Schéma des voies de signalisation de l'insuline dans la cellule endothéliale (Potenza 2009).

La voie des Ras/MAPK est généralement plus impliquée dans la croissance, la différenciation et la mitose, et provoque la production d'endothéline (Potenza 2005, Potenza 2006). Toujours lors de l'activation du récepteur à l'insuline, la protéine d'amarrage Shc est phosphorylée sur un résidu tyrosine et activée, et elle peut ainsi se lier au domaine SH2 de la protéine Grb2 (Src homology 2 domain de growth factor receptor-bound protein 2) (Nystrom 1999). Cette liaison permet l'activation de Sos (Son of Sevenless), facteur échangeur de GTP lié à Grb2. Lorsque

Le complexe Shc-Grb2-Sos est fixé au récepteur à l'insuline, Sos devient active et dissocie le GDP de Ras, ce dernier pouvant donc se lier au GTP et s'activer pour initier une cascade de phosphorylation impliquant Raf, MAPK/MEK, et MAPK. Au final, cette voie de signalisation aboutit à la stimulation de la production de l'ET-1 (Potenza 2009). Cependant, cette voie n'est généralement pas active en conditions physiologiques, la voie majeure étant celle des PI3K décrite ci-dessus (Kim 2006).

L'insuline pourrait aussi provoquer une augmentation brutale de ROS notamment de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schmid 1999, Goldstein 2005). Des faibles niveaux de ROS pourraient aider à la signalisation provoquée par l'insuline, alors que de hauts niveaux sont responsables de résistance à l'insuline et de dysfonction endothéliale (Potenza 2009). L'insuline peut aussi par la voie des MAPK stimuler l'expression de VCAM1 et de la E-selectine à la surface des cellules endothéliales (Montagnani 2002).

### **1.1.6 Conclusion sur la physiologie de la fonction endothéliale**

La vasomotricité est un processus finement régulé. Par l'action de différents stimuli sur les cellules endothéliales, ces dernières libèrent un grand nombre de médiateurs qui participent au maintien de l'homéostasie vasculaire en stimulant différentes voies de signalisation des cellules musculaires lisses sous-jacentes. Parmi ces médiateurs, le NO, la PGI<sub>2</sub> et les EDHF ont des effets vasodilatateurs sur les cellules musculaires lisses, tandis que l'ET-1, les prostanoïdes vasoconstricteurs et les ROS ont des effets vasoconstricteurs. De plus il existe de nombreuses interactions entre les voies de signalisation de ces différents médiateurs. L'altération d'un ou plusieurs de ces mécanismes pourrait donc avoir d'importantes répercussions sur la régulation du tonus vasculaire et donc de la perfusion.

## ***1.2 La dysfonction endothéliale et les risques cardiovasculaires***

### **1.2.1 La dysfonction endothéliale**

Les actions de la cellule endothéliale sont multiples et impliquent plusieurs systèmes. Les altérations de la fonction endothéliale peuvent affecter un ou plusieurs de ces systèmes, soit de façon simultanée soit à des temps différents. Aucune définition ne couvre l'ensemble des possibilités d'altération impliquées dans la dysfonction endothéliale. En conséquence, la dysfonction endothéliale a été définie de façon pragmatique comme une diminution de la réponse vasodilatatrice des vaisseaux, pouvant être causée par une diminution de la disponibilité des facteurs vasodilatateurs synthétisés par l'endothélium, une diminution de la réponse des cellules musculaires lisses à ces facteurs, ou une augmentation de la production des facteurs vasoconstricteurs (Calles-Escandon 2001). L'homéostasie vasculaire est maintenue par une balance entre les facteurs vasodilatateurs et les facteurs vasoconstricteurs. Lorsque cet équilibre est rompu, cela prédispose le système vasculaire à la vasoconstriction, l'adhérence des leucocytes, l'activation plaquettaire, la mitogenèse, l'oxydation, la coagulation, la thrombose, l'inflammation, la perméabilité aux macromolécules, et l'athérosclérose.

L'implication essentielle de la dysfonction endothéliale dans le développement de la plaque d'athérome a été observée pour la première fois en 1986 par Ludmer et coll. (Ludmer 1986). Par la suite, la dysfonction endothéliale a été décrite dans de nombreux troubles cardiovasculaires et métaboliques, comme l'hypertension, la maladie coronaire, la dyslipidémie, ou encore le diabète de type 1 et 2. La dysfonction endothéliale semble précéder un grand nombre de ces troubles cardiovasculaires comme l'hypertension et l'athérosclérose, où une vasoconstriction anormale peut être à l'origine du développement de la plaque. Ainsi, la dysfonction endothéliale pourrait être un marqueur précoce d'anomalies vasculaires (Brunner 2005, Taddei 2002).

En effet, en présence de facteurs de risque cardiovasculaire, la dysfonction endothéliale peut être détectée bien avant l'apparition des anomalies liées à ces facteurs de risque qui sont

observées en clinique par angiographie. De nombreux facteurs de risque cardiovasculaire, dont l'hyperlipidémie, l'hypertension, le diabète et le tabac, sont associés à une augmentation de la production de ROS, augmentant le stress oxydatif qui diminue la biodisponibilité du NO et cause des dommages cellulaires. De plus, l'augmentation du stress oxydatif est considérée comme étant le mécanisme majeur impliqué dans la pathogénèse de la dysfonction des cellules endothéliales, et pourrait être un mécanisme pathogène commun des effets des différents facteurs de risque sur l'endothélium (Grover-Paez 2009).

## **1.2.2 Dysfonction endothéliale et facteurs de risque cardiovasculaire**

### ***1.2.2.1 Le tabagisme***

L'association entre le tabagisme et les risques cardiovasculaires est depuis longtemps clairement établie (Sackett 1968, Brunner 2005). Elle passe par la diminution du flux sanguin coronaire et la libération d'oxygène au myocarde (Martin 1984, Deanfield 1986), et le tabagisme est l'un des principaux facteurs de risque cardiovasculaire pour le développement de l'athérosclérose (Grover-Paez 2009). Parmi les mécanismes mis en jeu lors de l'augmentation des risques cardiovasculaires par le tabagisme, les dommages causés à l'endothélium prennent une place importante, et ont été démontrés dans la circulation coronaire (Zeiber 1995) et périphérique (Celermajer 1993).

Les cellules endothéliales exposées à la fumée de cigarette développent un aspect irrégulier avec une membrane désorganisée et un comportement fonctionnel fortement perturbé par la diminution de la eNOS, une augmentation de la production des adhésines, et un dysfonctionnement de la balance thrombotique locale (Newby 1999, Newby 2001). La dysfonction endothéliale a été mise en évidence chez des fumeurs asymptomatiques, sans cardiopathie coronaire, chez qui le flux sanguin coronaire de réserve était réduit de 21% (Kaufmann 2000). La fumée de cigarette est une mixture chimique complexe contenant en grande partie des ROS qui peuvent endommager directement les cellules endothéliales, ou indirectement par la peroxydation des lipides ou l'inactivation du NO en peroxydinitrite.

Appuyant l'hypothèse d'une forte implication des ROS, il a été démontré qu'une administration de vitamine C, qui est un puissant antioxydant, pouvait normaliser le flux sanguin coronaire de réserve des fumeurs, et n'avait aucun effet sur les non-fumeurs (Kaufmann 2000). Plusieurs études ont mis en évidence que la dysfonction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères coronaires et périphériques était liée à l'intensité de l'exposition à la fumée de tabac, chez les fumeurs actifs (Celermajer 1993, Zeiher 1995, Who 1997) et passifs (Celermajer 1996, Raitakari 1999).

Néanmoins, peu de choses sont connues au sujet de l'interaction du tabagisme chronique avec les éléments spécifiques de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, tout comme la relation causale entre le tabagisme, la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose (Brunner 2005, Grover-Paez 2009)

### ***1.2.2.2 La dyslipidémie***

Le cholestérol est un important facteur de risque de la maladie coronaire. L'hypercholestérolémie est fortement associée à la dysfonction endothéliale dans la circulation périphérique et coronaire. L'hypercholestérolémie familiale est associée au développement de la dysfonction endothéliale, bien avant les manifestations cliniques de cardiopathies ischémiques. Chez des enfants atteints d'hypercholestérolémie familiale, les concentrations de cholestérol et de lipoprotéines sont inversement liées à la vasodilatation de l'artère brachiale induite par le flux (Celermajer 1992, Sorensen 1994, deJongh 2002). Une réduction de la réserve coronaire a été observée chez des sujets hypercholestérolémiques mais asymptomatiques et, présentant des artères coronaires normales lors d'examens par angiographie, avec l'existence d'une corrélation inverse entre la réserve coronaire et le taux de lipides. Cette réduction est réversible par un traitement hypocholestérolémiant (Dayanikli 1994, Gould 1994, Czernin 1995). La production de NO par les cellules endothéliales semble être augmentée par l'hypercholestérolémie, tandis que sa biodisponibilité dans les artères coronaires est diminuée, même lorsque l'examen par angiographie est normal (Quyuyumi 1997). Dans l'hypercholestérolémie l'endothélium génère de façon excessive des ROS, qui sont non seulement capables d'inactiver le NO mais qui peuvent également augmenter des processus d'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL pour Low-Density Protein) et



favoriser les dommages sur les membranes cellulaires des cellules endothéliales par la génération de peroxy-nitrites et de radicaux hydroxyles (O'Brien 1997, Brunner 2005). La diminution des niveaux de cholestérol chez des patients atteints de maladie coronaire diminue les risques d'infarctus du myocarde, et cet effet protecteur peut en partie être dû à l'amélioration de la fonction endothéliale, par l'amélioration de la production et de la libération du NO. En plus d'une thérapie réduisant les lipides, l'administration du BH<sub>4</sub>, cofacteur essentiel pour la production de NO, peut restaurer la production de NO chez des patients atteints d'hypercholestérolémie (Verhaar 1999, Masumoto 2001).

L'impact des triglycérides sur la fonction endothéliale est controversé. Chez des patients atteints d'hypertriglycéridémie chronique, la vasodilatation induite par la sérotonine est altérée, alors que la réponse à l'acétylcholine ne change pas. Ces résultats suggèrent que les deux voies de signalisation impliquant les protéines G dans la production de NO par la cellule endothéliale ne sont pas affectées de la même façon par les triglycérides. La voie de signalisation impliquant la protéine G<sub>i</sub> pourrait être altérée ; en situation normale, cette protéine est activée entre autres par le récepteur à la sérotonine. Par contre, la voie de signalisation activant la protéine G<sub>q</sub> serait préservée ; en effet, elle semble toujours activée par le récepteur muscarinique à l'acétylcholine des cellules endothéliales (Chowienczyk 1997, de Man 2000). Par ailleurs, la vasodilatation de l'artère brachiale évaluée par vasodilatation induite par le flux est altérée suite à l'administration de triglycérides chez des sujets sains (de Man 2000, Gudmundsson 2000, Lundman 2001). L'hypertriglycéridémie coexiste souvent avec une résistance à l'insuline, et il semblerait que ce soit plutôt cette dernière qui est à l'origine de la dysfonction endothéliale (Jonkers 2002).

Une diminution des concentrations plasmatiques en lipoprotéines de haute densité (HDL pour High-Density Lipoprotein) pourrait aussi affecter la fonction endothéliale, indépendamment des LDL (Kuvin 2002, Lupattelli 2002). Une infusion de cholestérol HDL reconstitué chez des patients hypercholestérolémiques, de même qu'une restauration de la concentration plasmatique en HDL chez des patients atteints d'alphaalipoprotéïnémie, améliore la fonction endothéliale (Spieker 2002, Basisoendial 2003).

### ***1.2.2.3 L'obésité***

La fonction endothéliale associée à l'obésité n'a pas été étudiée de façon aussi intensive que les autres facteurs de risque (Brunner 2005). Chez les personnes obèses, la dysfonction endothéliale a été documentée dans les artères de résistance et de conductance de différents lits vasculaires, indépendamment des autres comorbidités.

Au niveau des artères de résistance des sujets obèses, une vasodilatation réduite a été observée suite à une perfusion intra artérielle d'agonistes muscariniques lors de différentes études, bien que les résultats ne soient pas entièrement compatibles (Tack 1998). Les mesures du débit sanguin de la jambe en imagerie PET ont démontré qu'un taux deux fois plus élevé de bradykinine en perfusion a été nécessaire pour induire une vasodilatation de 70% chez des personnes obèses par rapport à des individus témoins (Laine 1998). Dans une autre étude, la réponse du flux sanguin de la jambe à la méthacholine, un analogue de l'acétylcholine, était affaiblie chez des personnes obèses avec ou sans diabète de type 2, tandis que la vasodilatation indépendante de l'endothélium était normale (Steinberg 1996). Ces estimations de la fonction endothéliale étaient significativement corrélées avec l'indice de masse corporelle, ce qui ne suggère aucun effet additif de l'obésité et du diabète. En revanche, l'hypertension et l'obésité semblent être additives (Higashi 2001). En ce qui concerne les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale dans le cadre de l'obésité, il n'existe aucune preuve que la diminution de la réponse aux agonistes muscariniques dépende d'une altération de la synthèse de NO. En outre, la dysfonction endothéliale est partiellement restaurée par la vitamine C ou l'indométacine, suggérant qu'elle pourrait être en partie liée aux ROS ou aux produits des COX, ou aux deux (Perticone 2001). Par l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur ET<sub>A</sub> (Mather 2002), il a été récemment démontré chez les patients obèses une augmentation du tonus basal liée à l'ET-1: lorsque les récepteurs ET<sub>A</sub> sont bloqués, une perfusion intra artérielle de méthacholine induit une vasodilatation similaire chez les patients obèses et contrôles, ce qui implique que le déséquilibre du tonus de l'ET-1 contribue à la dégradation de la dilatation dépendante de l'endothélium chez les patients obèses. La perte de poids (dans l'ordre de 10% du poids corporel initial) réalisée par régime seul n'a pas influencé significativement la réponse des artères de résistance. L'effet a été plus marqué lorsque le régime a été associé soit à de l'exercice physique (Ziccardi 2002, Sciacqua 2003) soit à une prise d'orlistat, qui retient l'absorption des lipides (Bergholm 2003). Avec ce dernier, l'amélioration de la réactivité vasculaire est en corrélation avec la variation du taux

de cholestérol LDL ; avec l'exercice, l'amélioration de la réactivité vasculaire et la diminution des facteurs de l'activation endothéliale et de l'inflammation sont liées aux variations de concentration plasmatique de l'insuline. Les études dans des modèles animaux d'obésité sont quelque peu contradictoires. Dans l'ensemble, elles suggèrent que la dysfonction endothéliale dépend en grande partie de la résistance à l'insuline, et est sélective de la voie PI3K/Akt (Jackson 1998).

En ce qui concerne les grosses artères, une forte diminution de la vasodilatation induite par le flux des artères brachiales et fémorales avec une réponse conservée aux nitrates a été constatée chez des personnes atteintes d'obésité (Brook 2001). Toutes les études ont rapporté une plus forte corrélation avec les indices de la répartition des graisses centrales qu'avec l'adiposité globale. Il y a peu d'information disponible chez les patients obèses présentant une hypertension essentielle ou un diabète. La réduction du poids avec un régime alimentaire et de l'exercice a amélioré la vasodilatation induite par le flux en proportion avec la variation de poids et indépendamment de la présence d'un diabète ou d'une intolérance au glucose (Hamdy 2003).

### ***1.2.2.4 L'hypertension***

Un déséquilibre chronique entre les facteurs de relaxation et de contraction dérivés de l'endothélium pourrait mener à une réponse vasodilatatrice anormale et à une augmentation de la pression sanguine. Le NO induit la vasodilatation, empêche l'adhérence des plaquettes et des globules blancs à l'endothélium, empêche l'agrégation plaquettaire, et empêche la croissance des cellules musculaires lisses. En même temps que le NO, l'EDHF semble être un déterminant important des résistances vasculaires dans les petites artères. La dysfonction endothéliale est un marqueur important de l'hypertension essentielle (Panza 1990), et elle a été associée à des événements cardiovasculaires lors d'études longitudinales chez des patients hypertendus (Taddei 2002). La vasodilatation dépendante de l'endothélium en réponse aux stimuli physiques (stress de cisaillement) ou chimiques (acétylcholine, bradykinine, substance P,...) est altérée dans l'avant-bras, les coronaires, la circulation rénale, et plusieurs lits microvasculaires de patients hypertendus (Féletou 2006).

Le stress oxydant dans la paroi vasculaire et l'hypertrophie vasculaire pourraient contribuer à diminuer la biodisponibilité de NO et par conséquent la vasodilatation endothélium dépendante. Le taux de ROS est élevé chez les patients hypertendus, en raison d'une augmentation de la production de ces ROS, une diminution de l'activité des anti-oxydants, ou encore une réduction de la capacité à inactiver les ROS (Tomita 1995). Ces ROS peuvent être produits par la NADPH oxydase, les cyclooxygénases, ou la eNOS découplée. L'administration de vitamine C restaure la vasodilatation dépendante de l'endothélium au niveau de la circulation coronaire et de l'avant-bras (Solzbach 1997, Taddei 1998). Le système rénine-angiotensine semble jouer un rôle majeur dans la production de ROS par l'activation de la NADPH oxydase (Lassègue 2004). Cela se traduit par un déséquilibre de la bioactivité du NO, causé par les ROS qui désactivent le NO (Taddei 1998).

L'implication de la voie de signalisation de l'endothéline peut de plus accentuer le stress oxydatif (Pollock 2005). Le niveau d'endothéline plasmatique n'est pas corrélé avec la pression sanguine chez les patients hypertendus, et chez la plupart des patients ces niveaux ne sont même pas élevés (Schiffrin 2005). Pourtant, le blocage des récepteurs à l'endothéline permet d'améliorer la pression sanguine (Krum 1998, Nakov 2002) et la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine (Cardillo 1999, Cardillo 2002, Gluais 2005). L'activité de l'ET-1 augmente à mesure que la biodisponibilité du NO diminue, et un déséquilibre entre ces deux systèmes pourrait conduire à une augmentation de la vasoconstriction et de l'activité proliférative de l'ET-1 (Schiffrin 1999).

Plusieurs études ont montré que la eNOS est importante dans la régulation des fonctions vasculaires. Une altération de la production de NO chez les sujets hypertendus peut être causée par le polymorphisme du gène codant pour la eNOS (Nakayama 1999, Rossi 2003), une déficience du cofacteur BH4 (Higashi 2002), une altération du transport de la L-arginine (Schlaich 2004), ou encore une augmentation du niveau plasmatique de la diméthylarginine asymétrique (ADMA), un inhibiteur de la eNOS (Panza 1990, Takiuchi 2004, Vallance 1992). Une voie de signalisation impliquant les EDHF permet cependant de compenser la diminution de la biodisponibilité du NO dans l'hypertension (Taddei 1999).

L'inhibition des cyclooxygénases restaure partiellement la vasodilatation induite par l'acétylcholine dans l'avant-bras de patients souffrant d'hypertension essentielle, ce qui

suggère une production de facteurs vasoconstricteurs (Taddei 1993, Taddei 1997), et cette inhibition permet aussi d'augmenter la biodisponibilité du NO (Taddei 1997).

La dysfonction endothéliale est souvent présentée comme la cause de l'augmentation de la pression sanguine. Cependant, pour Brunner et coll., ce n'est pas possible puisque la dysfonction endothéliale n'est pas spécifique de l'hypertension, et se retrouve associée à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire. Il y a une dissociation entre le degré de dysfonction endothéliale et les valeurs de pression sanguine, et il semblerait que la dysfonction endothéliale soit déterminée génétiquement (Brunner 2005, Féléto 2006). Bien que la dysfonction endothéliale se retrouve dans la plupart des formes d'hypertension, elle ne semble pas être en cause dans l'augmentation de la pression sanguine. En effet, la dysfonction endothéliale impliquant une augmentation de libération de facteurs vasoconstricteurs est aussi présente chez des sujets normotendus ayant un historique familial de risque élevé de développer une hypertension essentielle (Taddei 1995). Chez les patients atteints d'hypertension secondaire, la dysfonction endothéliale semble être une conséquence de l'augmentation de la pression sanguine (Taddei 2000), alors que lors d'hypertension essentielle, la dysfonction endothéliale semble précéder l'élévation de la pression sanguine, sans pour autant en être forcément la cause (Taddei 1996).

### ***1.2.2.5 Le diabète***

La dysfonction endothéliale chez le patient diabétique a été décrite pour la première fois au niveau du corps caverneux pénien (Saenz de Tejada 1989). En milieu clinique, le diabète est un archétype de changements dans l'architecture microvasculaire : anomalie de la perméabilité capillaire, formation de microanévrismes, dépôt de matrice sous-endothéliale, fibrose entourant les artérioles, et enfin raréfaction des capillaires. Il en résulte une réduction des réserves du débit sanguin coronaire chez les patients diabétiques, même en absence d'obstruction des artères coronaires (Aneja 2008). La vasodilatation dépendante de l'endothélium est aussi altérée chez les patients diabétiques, ce qui peut être en partie dû à l'association fréquente entre le diabète et les autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension, l'obésité et la dyslipidémie (Versari 2009). Une fois mis en place, le dysfonctionnement de l'endothélium peut induire des changements vasculaires qui aggravent

la progression de la pathologie. De nombreuses études ont rapporté une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez des patients atteints de diabète de type 1 (Johnstone 1993, Nicolls 2007) et de type 2 (McVeigh 1992, Steinberg 1996, Ting 1996, Williams 1996). La dysfonction endothéliale a aussi été observée dans certaines conditions qui peuvent être associées au diabète comme l'obésité (Vita 1990, Hamdy 2003, Gokce 2005) et le syndrome métabolique (DeSouza 2000, Lteif 2005, Hamburg 2008). En plus des altérations de la vasodilatation, le diabète est associé à une augmentation de la production par l'endothélium de molécules d'adhésions et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, développant ainsi une réponse inflammatoire et thrombotique (Meigs 2000, Keaney 2004, Meigs 2004). La dysfonction endothéliale dans le diabète peut être induite par une combinaison d'hyperglycémie, d'acides gras, d'inflammation et de résistance à l'insuline (Calles-Escandon 2001).

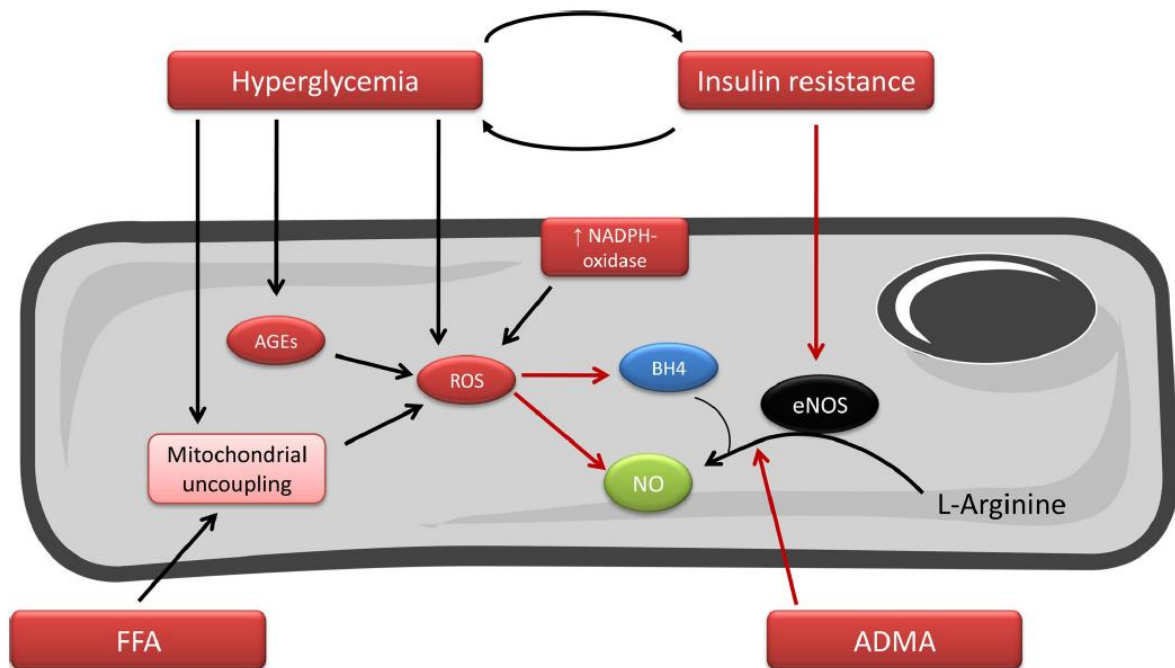


Figure 7 : Principaux mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale dans le diabète (Versari 2009).

La dysfonction endothéliale pourrait même précéder le développement du diabète. En effet, chez des sujets sains non diabétiques mais présentant un risque de développer un diabète de type 2, il a été observé une augmentation du niveau plasmatique de marqueurs de l'activation des cellules endothéliales (Caballero 1999, Balletshofer 2000, Tesauro 2007). L'altération de la vasodilatation de l'artère brachiale par le flux et le polymorphisme de la eNOS sont

associés au développement du diabète de type 2 (Monti 2003, Rossi 2005). Ces résultats suggèrent un lien entre la dysfonction endothéliale et le diabète. En effet, un traitement à la rosiglitazone ou à la troglitazone chez des patients atteints de diabète de type 2 améliore la fonction endothéliale des microvaisseaux de l'avant-bras (Mather 2001, Caballero 2003). Le diabète de type 2 pourrait impliquer une prédisposition génétique à la dysfonction endothéliale (Iellamo 2006).

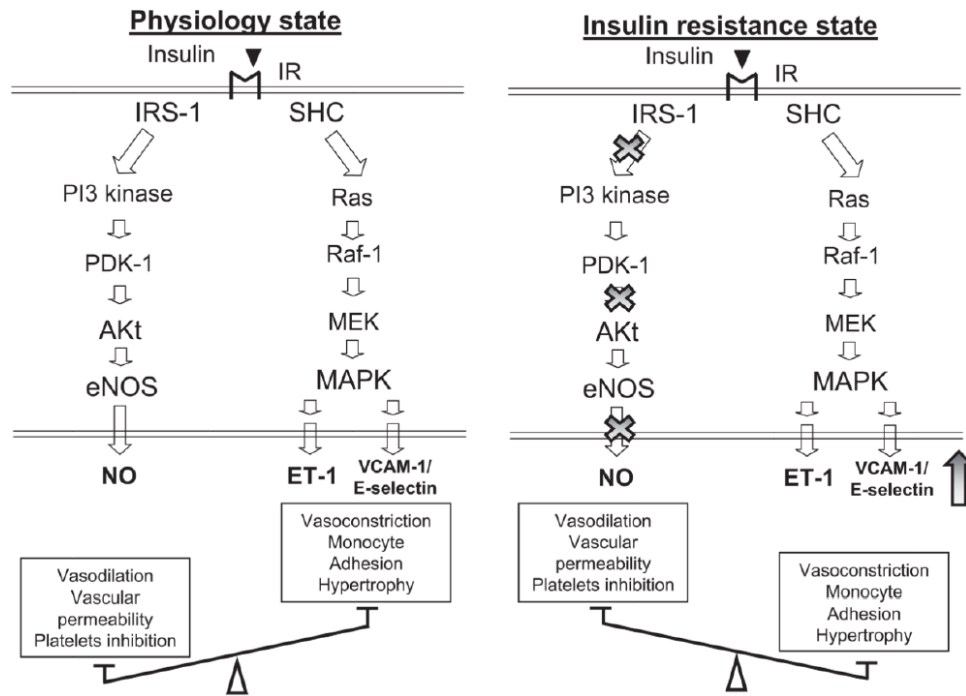


Figure 8 : Perturbation des voies de signalisation de l'insuline dans la cellule endothéliale en situation diabétique (Xu 2009).

La résistance à l'insuline est le principal mécanisme impliqué dans le diabète de type 2. Des études ont mis en évidence que la résistance à l'insuline est fortement associée au développement de la dysfonction endothéliale. En effet, la sensibilité à l'insuline est corrélée avec l'augmentation du flux sanguin de la peau induit par l'acétylcholine chez des femmes obèses (de Jong 2004) et avec la vasodilatation de l'artère brachiale induite par le flux chez des sujets non diabétiques (Balletshofer 2000, Campia 2004). La résistance à l'insuline mise en évidence par un test oral de résistance au glucose est associée à une dysfonction des artères coronaires (Shimabukuro 1995, Shinozaki 2001) et de la circulation de l'avant-bras (Lampinen 2008, Pasimeni 2006). L'augmentation des niveaux plasmatiques d'insuline est inversement corrélée avec la dilatation de l'artère brachiale induite par le flux (Ardigo 2006).

En situation diabétique de résistance à l'insuline, la voie de signalisation PI3K/Akt est inhibée dans les cellules endothéliales, diminuant ainsi l'activation de la eNOS, alors que la voie Ras/MAPK est conservée, conduisant entre autre à la production d'ET-1 et participant à la dysfonction endothéliale (Montagnani 2002, Wheatcroft 2003). Pour maintenir la glycémie plasmatique en situation de résistance à l'insuline, une augmentation de la sécrétion d'insuline compensatrice se met en place, qui pourrait accentuer l'activation de cette seconde voie de signalisation préservée. Il en résulte donc une diminution de la production de NO et une augmentation des niveaux plasmatiques de l'ET-1. Un blocage des récepteurs de l'ET-1 améliore la fonction endothéliale de sujets obèses et diabétiques. La dysfonction de l'endothélium pourrait aussi être en cause dans le développement de la résistance à l'insuline, notamment en diminuant le flux sanguin par une augmentation de la vasoconstriction et en diminuant la surface d'échange au niveau de la microcirculation (Kim 2006).

L'hyperglycémie favorise également la dysfonction endothéliale en réduisant la biodisponibilité du monoxyde d'azote et en augmentant la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène. L'hyperglycémie entraîne un grand nombre d'altérations cellulaires qui pourraient accélérer le développement de plaques d'athérome. Les effets néfastes de l'hyperglycémie peuvent inclure : la glycosylation non-enzymatique de protéines et de lipides qui vont interférer avec les autres protéines et avec les récepteurs, augmentant ainsi le stress oxydatif et la réponse inflammatoire ; l'activation de la protéine kinase C qui altère l'expression de facteurs de croissance ; la perturbation du fonctionnement de plusieurs enzymes par O-glycosylation ; l'augmentation du stress oxydatif, avec principalement l'ion superoxyde produit par la chaîne respiratoire de la mitochondrie ; la favorisation de l'inflammation par la sécrétion de cytokines (Brownlee 2001, Nathan 2003).

Les différents aspects du diabète décrits ci-dessus ont de nombreuses conséquences sur les voies de signalisation de la cellule endothéliale. Concernant le NO, l'hyperglycémie et le diabète diminuent sa biodisponibilité en agissant directement sur le NO libéré ou en altérant l'activité de la eNOS, conduisant à une diminution de la vasorelaxation (Gugliano 1996, Rask-Maden 2007). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante : une réduction de la biodisponibilité de BH4 et un découplage de la eNOS ; une augmentation de l'activité de l'arginase qui entre en compétition avec la eNOS pour utiliser la L-arginine comme substrat ; une augmentation de la présence de la ADMA qui inhibe la eNOS ; une augmentation des anions superoxydes qui inactivent le



NO en peroxy-nitrite ; la désactivation de NO par les AGEs ; une diminution de la réponse des cellules musculaires lisses au NO (Vanhoutte 2009a) ; l'activation de la voie de signalisation des protéines kinases (Beckman 2002) ; la modification post-traductionnelle de la eNOS par la voie des hexosamines (Du 2001) ; la diminution de l'expression de la eNOS (Veves 1998). Par exemple, l'hyperglycémie liée au diabète peut mener à la modification de macromolécules en formant des produits de glycation avancée (Advance Glycation End-products ou AGEs). Les AGEs sont connus pour favoriser l'inflammation vasculaire et le dysfonctionnement endothélial. En se liant aux récepteurs de surfaces tels que les RAGEs (récepteur des AGEs), ces protéines peuvent augmenter la production de cytokines proinflammatoires et activer d'autres voies inflammatoires dans les cellules endothéliales. Les AGEs dans le diabète de type 2 induisent la modification de la sérine 1177 de la eNOS par N-acétyl O-glycosylation. Les protéines ainsi modifiées tendent à être sous-phosphorylées, et il a été suggéré que la O-GlcNAc pourrait masquer les sites de phosphorylation et donc interférer avec des mécanismes de signalisation, et atténuer la production de NO dans le cas de la eNOS (Du 2001, Federici 2002, Xu 2003). Par ailleurs, la production de PGI<sub>2</sub> chez les patients diabétiques est diminuée et il a été proposé que cette déficience pourrait accélérer le développement athérosclérotique chez ces patients (Johnson 1979, Harrison 1980).

L'insuline et le glucose jouent également un rôle dans la libération de l'ET-1. L'insuline active la production de l'ET-1 par les cellules endothéliales, comme expliqué précédemment, et l'hyperglycémie conduit à la formation des AGEs qui favorisent la production de l'ET-1 par les cellules endothéliales par l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Les niveaux plasmatiques d'endothéline sont plus élevés chez les patients diabétiques de type 2, accompagnés d'une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de molécules d'adhésions (el-Mesallamy 2007). L'endothéline pourrait jouer un rôle important dans le développement de pathologies artérielles dans le diabète (Sarman 1998). L'augmentation de facteurs vasoconstricteurs pourrait contribuer à l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium. De plus, l'exposition des cellules endothéliales à des taux élevés de glucose peut entraîner l'augmentation de stress oxydant et l'activation des cyclooxygénases (Vanhoutte 2009a).

Le diabète est associé à une augmentation du niveau d'acides gras libres circulants (Tripathy 2003b), et il a été démontré qu'une augmentation du niveau plasmatique d'acides gras libres par infusion pouvait altérer la vasodilatation dépendante de l'endothélium et même provoquer

une résistance à l'insuline (Capablo 1988, Boden 1995). Une consommation hypercalorique peut induire un dysfonctionnement de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Vogel 1997), la consommation de protéines, de lipides et de glucose étant associée à une augmentation de la production de ROS (Mohanty 2000, Mohanty 2002). Les acides gras libres peuvent aussi induire du stress oxydatif et altérer la fonction endothéliale (Tripathy 2003a). De plus, la relaxation dépendante de l'endothélium peut être améliorée grâce à l'action d'antioxydants (Diederich 1994, Taylor 1994, Tesfamariam 1994, Voinea 2004). Chez des patients obèses diabétiques de type 2, les acides gras libres peuvent agir sur la voie de signalisation impliquant la PI3K et diminuer la production de NO, mais aussi diminuer la biodisponibilité de NO en contribuant à la production de ROS (Smith 1999, Tripathy 2003b). En induisant du stress oxydant, l'hyperglycémie et les acides gras libres favorisent la présence de l'ion superoxyde qui contribue au développement de la dysfonction endothéliale (Reaven 1988, Inoguchi 2000, Tripathy 2003b). L'ion superoxyde réagit rapidement avec le NO et forme le peroxynitrite qui joue un rôle central dans le développement de la dysfonction endothéliale (Pacher 2007, Szabo 2007).

Le diabète de type 2 et l'obésité sont associés à une augmentation de la réponse inflammatoire comme indiqué par une augmentation de la production de TNF $\alpha$ , de la protéine C-réactive, de l'interleukine-6, et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (Dandona 2004, Hotamisligil 1993). Le glucose et la suralimentation pourraient être en cause dans l'augmentation de la réponse inflammatoire et le stress oxydant. De plus, le TNF $\alpha$  et l'interleukine-6 interfèrent avec les effets anti-inflammatoires de l'insuline (Dandona 2004). L'inflammation est un acteur important non seulement dans la dysfonction endothéliale, mais aussi dans la résistance à l'insuline et l'athérosclérose (Valance 1997, Stenvinkel 2001, Caballero 2004).

En conclusion, la dysfonction endothéliale chez les sujets diabétiques est principalement causée par l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et l'inflammation, qui conduisent à une diminution de la biodisponibilité du NO et une augmentation de la production de ROS et de facteurs vasoconstricteurs. Les nombreuses études disponibles et la diversité des résultats soulignent la complexité des mécanismes physiopathologiques qui sont responsables de l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans le diabète. Ces mécanismes peuvent agir non seulement sur la molécule vasodilatatrice, mais aussi sur les différentes

voies de signalisation de la cellule endothéliale. La dysfonction endothéliale au sein du diabète pourrait être en partie due à la présence de facteurs de risque, comme l'hypertension, l'obésité ou la dyslipidémie, et provoquer d'importantes conséquences sur le développement du diabète et de la plaque d'athérome.

#### ***1.2.2.6 L'athérosclérose***

L'athérosclérose est considérée comme une maladie dynamique et progressive résultant de la combinaison d'une hypercholestérolémie et de la dysfonction endothéliale, dont la composante principalement impliquée est l'inflammation. Ludmer et coll. ont initialement décrit une vasoconstriction anormale en réponse à l'acétylcholine au niveau d'artères coronaires présentant des plaques d'athérome, conduisant ainsi au concept que la dysfonction endothéliale occupe une place importante dans le développement de la maladie athérosclérotique (Ludmer 1986). La dysfonction endothéliale précède le développement des plaques d'athérome et se développe en réponse à plusieurs des facteurs de risque cardiovasculaire que nous venons de détailler ci-dessus (Ross 1993, Shimokawa 1999). La dysfonction endothéliale semble être un lien commun entre les facteurs de risque cardiovasculaire et la formation de plaques athérosclérotiques. La dysfonction endothéliale participe à la formation de la plaque en favorisant la coagulation, l'expression des molécules d'adhésion, la sécrétion des chémokines, l'adhésion des leucocytes, la perméabilité cellulaire, l'oxydation des LDL, l'activation des plaquettes, l'élaboration de cytokines, et la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Verma 2002, Cersosimo 2006).

De plus, les plaques d'athérome sont elles-mêmes responsables de dysfonctions de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium dans la circulation coronaire et périphérique (Shimokawa 1989, Anderson 1995b). En effet, l'altération de la vasodilatation dépendante du flux des artères coronaires de l'épicarde est maintenue dans les stades précoces du développement des lésions athérosclérotiques (Cox 1989, Nabel 1990, Zeiher 1994). Par la suite, lors de l'évolution de la plaque, les artères coronaires souffrant d'athérosclérose présentent un défaut de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et une augmentation de la vasoconstriction. Enfin, la vasodilatation dépendante de l'endothélium est aussi altérée dans la microcirculation coronaire chez les patients ayant des plaques d'athérome développées (Zeiher 1991), avec

probablement en cause un défaut au niveau des récepteurs de la cellule endothéliale, la réponse vasodilatatrice indépendante des récepteurs membranaires étant conservée (Bossaller 1987). La fonction vasodilatatrice de l'endothélium chez des patients atteints d'athérosclérose peut être améliorée par la prise d'antioxydants, montrant ainsi l'importance de la production de stress oxydatif dans l'évolution de cette pathologie (Anderson 1995a, Levine 1996). De plus, par ses mécanismes vasoconstricteurs et inflammatoires, la dysfonction endothéliale peut agir sur l'architecture de la plaque et favoriser la vulnérabilité et la rupture de cette dernière (Libby 2001).

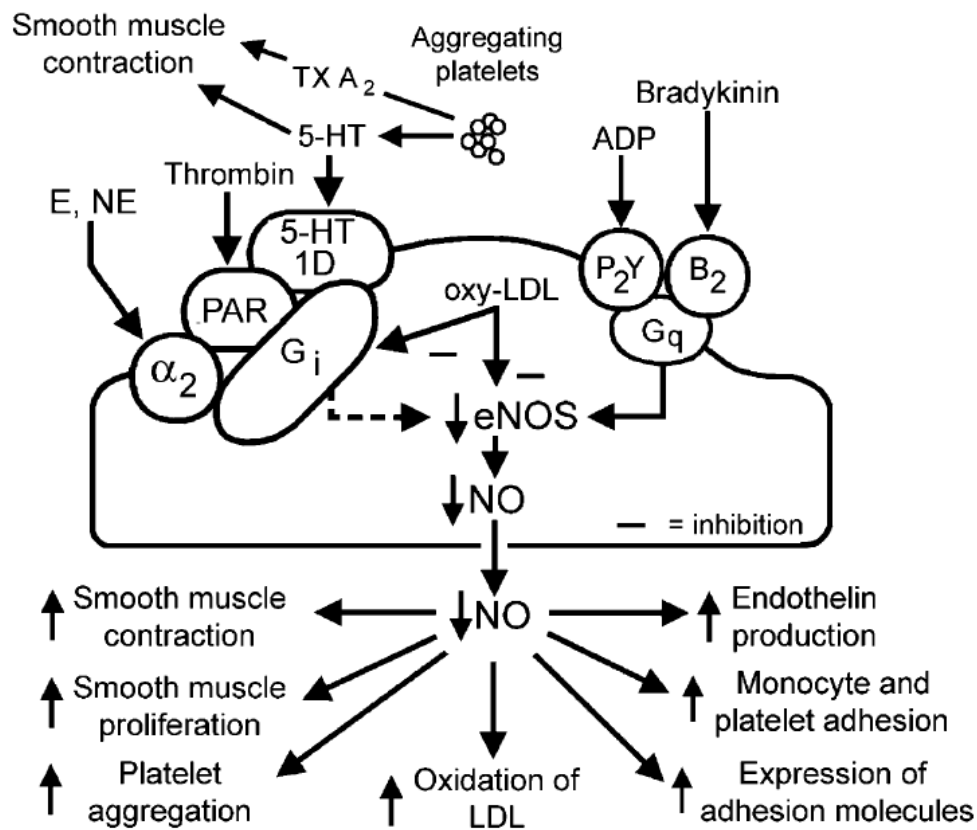


Figure 9 : Effets des LDL oxydés sur la cellule endothéliale régénérée (Michel 2010).

Le renouvellement des cellules endothéliales joue également un rôle important dans le développement de la dysfonction endothéliale et des plaques d'athérome (Shimokawa 1999, Vanhoutte 2009b). La durée de vie moyenne d'une cellule endothéliale est estimée à 30 ans et le renouvellement peut être accéléré par des facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension et le diabète (Vanhoutte 1997, Vanhoutte 2009b). Cependant, l'endothélium régénéré de façon normale ou pathologique présente des dysfonctionnements, avec notamment une diminution de la production de NO dans la réponse vasodilatatrice induite par

la voie des protéines Gi et une augmentation du stress oxydatif. De plus, la diminution de l'expression de la protéine Gi est corrélée avec l'étendue de l'athérosclérose (Tsutsui 1994, Vanhoutte 1989, Vanhoutte 2009b). La diminution de la biodisponibilité du NO et l'oxydation des LDL favorisent les processus inflammatoires conduisant à la formation de plaques d'athéromes (Vanhoutte 2009b).

### **1.2.3 Conclusion sur la dysfonction endothéliale**

L'endothélium joue un rôle central dans la régulation du tonus et le maintien de l'intégrité des vaisseaux, grâce à la production finement régulée de nombreux facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. L'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium peut être la conséquence de la perturbation d'un ou plusieurs de ces systèmes, et peut s'exprimer par une dégradation de la biodisponibilité des facteurs vasodilatateurs ou par une augmentation de la production des facteurs vasoconstricteurs. Ces modifications complexes et hétérogènes sont à la base de la dysfonction endothéliale qui peut affecter grandement l'intégrité des organes. Les anomalies de la fonction endothéliale sont associées à de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire et peuvent fortement contribuer à leur développement, et principalement favoriser la mise en place de la plaque d'athérome. La dysfonction endothéliale semble aussi précéder un certain nombre de pathologies cardiovasculaires, bien avant l'apparition des signes cliniques liés à ces maladies. L'étude et la mesure de la dysfonction endothéliale présente donc un grand intérêt clinique, et pourrait devenir un important facteur de risque à prendre en compte dans la prise en charge des patients.

## **2 Mesure de la dysfonction endothéliale et des altérations de la perfusion du myocarde**

La vasomotricité dépendante de l'endothélium est un critère clinique important pour déterminer la fonction endothéliale. Une technique de mesure de la dysfonction endothéliale sur un plan individuel et pouvant être utilisée en routine clinique pourrait permettre de détecter de façon précoce la mise en place de pathologies cardiovasculaires. Cependant, il n'existe à ce jour qu'une seule technique non invasive correctement validée et couramment utilisée pour la mesure directe de l'altération de la vasodilatation, qui consiste à observer la vasodilatation d'une grande artère lors d'une augmentation du flux sanguin. D'autre part, les examens cliniques disposent de plusieurs modalités d'imagerie non invasives qui par l'observation de l'état de la perfusion peuvent mettre en évidence des conséquences de la dysfonction endothéliale.

### ***2.1 Mesure de la dysfonction endothéliale***

#### **2.1.1 Mesure invasive de la dysfonction endothéliale**

La vasomotricité dépendante de l'endothélium a été l'indice le plus largement utilisé pour l'évaluation clinique de la fonction endothéliale. Les tests comprennent des stimulations pharmacologiques et / ou physiologiques de la libération endothéliale de NO et d'autres composés vasoactifs, et les réponses vasculaires sont souvent comparées à l'action de composés vasodilatateurs indépendants de l'endothélium tels que la nitroglycérine. La détermination de la biodisponibilité du NO locale ne reflète pas seulement son influence sur le tonus vasculaire, mais aussi les autres fonctions importantes de cette molécule, qui comprennent la régulation de la thrombose, l'adhésion cellulaire et la prolifération (Deanfield 2007).

Les études cliniques initiales de la fonction endothéliale ont été entreprises dans la circulation coronaire, et suite à une perfusion locale d'acétylcholine, la variation du diamètre des vaisseaux coronaires était mesurée par angiographie quantitative (Ludmer 1986, Cox 1989). Cette approche est un analogue clinique direct de l'expérience originale de Furchgott et Zawadzki. Elle est invasive puisqu'elle nécessite de placer un cathéter cardiaque, ce qui limite son usage. L'acétylcholine provoque la libération de NO par les vaisseaux avec un endothélium intact, ce qui conduit à une vasodilatation, mais provoque une vasoconstriction chez des sujets présentant une dysfonction endothéliale, à la suite d'un effet direct muscarinique vasoconstricteur des muscles lisses. Les doses qui donnent lieu à des concentrations sanguines finales de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  mol sont les plus appropriées pour l'évaluation de la gamme physiologique de réponse (Okumura 1992). Par la suite, ces méthodes ont été affinées à l'utilisation des sondes Doppler pour mesurer la fonction de résistance des vaisseaux (Drexler 1991). Les réponses à un large éventail d'agonistes endothéliaux qui incluent la substance P, l'adénosine et la bradykinine ont également été mesurées, ainsi que les réponses physiologiques à un test au froid et de la vasodilatation induite par le flux des artères proximales suite à une perfusion distale d'adénosine (Nabel 1990a). En outre, l'utilisation d'antagonistes spécifiques du NO tels que la L-NMMA a défini la contribution de NO à ces réponses vasomotrices (Goodhart 1998). Ces études ont fourni des indications précieuses sur les effets des facteurs de risque vasculaire et la réversibilité potentielle de la dysfonction endothéliale en réponse à des interventions telles que les statines et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Anderson 1995a, Mancini 1996).

Bien que ces tests permettent d'évaluer directement la circulation coronaire, leur caractère invasif limite leur utilisation aux patients ayant une maladie avancée, et s'oppose à des tests répétés au cours d'une série de suivis. Puisque la dysfonction endothéliale est un processus systémique, une approche moins invasive a été développée qui utilise les mêmes principes de perfusion locale de sondes pharmacologiques et la mesure des changements dans le tonus des vaisseaux de résistance de l'avant-bras par pléthysmographie à occlusion veineuse (Joannides 2006). Ceci a fourni l'occasion d'évaluer la physiopathologie endothéliale au stade préclinique de la maladie par l'utilisation des agonistes et antagonistes appropriés à la détermination de courbes de la réponse en fonction de la dose. Une corrélation entre les réponses à l'acétylcholine dans la circulation coronaire et dans l'avant-bras a été démontrée. La pléthysmographie à occlusion veineuse a été largement utilisée, mais elle reste invasive

par la nécessité d'une cannulation artérielle. Cela limite sa répétitivité et interdit son utilisation dans des études plus larges. Les résultats sont également difficiles à standardiser car le tonus des vaisseaux de référence de résistance est variable, et les protocoles d'essai et de mise en place diffèrent entre les laboratoires de recherche (Deanfield 2007).

### **2.1.2 Mesure non invasive de la dysfonction endothéliale : Flow Mediated Vasodilatation**

Les vaisseaux sanguins ont la capacité de répondre à des stimuli physiques et chimiques provenant de la lumière, et donc d'auto-réguler leur tonus pour ajuster le flux sanguin et la distribution en réponse aux changements locaux de l'environnement. La plupart des vaisseaux répondent à une augmentation du flux, et donc à un stress de cisaillement, par une vasodilatation. Ce phénomène est appelé vasodilatation induite par le flux (Flow Mediated vaso-Dilatation ou FMD), dont le principal médiateur est le NO dérivé de l'endothélium (Joannides 1995). L'étude de la FMD est actuellement la technique non invasive la plus utilisée en clinique pour mettre en évidence l'état de la fonction endothéliale sur une large artère de la circulation systémique. Mise au point en 1992 par Celermajer et coll., cette méthode repose sur la mesure du diamètre de l'artère brachiale par ultrasons avant et après augmentation du stress de cisaillement induite par hyperhémie réactionnelle post-ischémique (Celermajer 1992). Une diminution de la FMD indique une diminution de la biodisponibilité du NO, et donc une dysfonction endothéliale associée à un risque de pathologie cardiovasculaire plus élevé.

Le patient doit être à un jeun depuis 8 à 12 heures et ne doit pas avoir pris de caféine ou fumé avant la mise en place de l'étude. De plus, il ne doit pas avoir fait d'exercice et tout traitement vasoactif doit être stoppé. Le patient doit être allongé dans une pièce sombre et silencieuse où la température doit être comprise entre 20 et 25°C. Un sphygmomanomètre est placé sur l'avant-bras, en position distale par rapport à l'artère brachiale. Il est gonflé à 200 mmHg pour induire l'ischémie, ou à 50 mmHg au dessus de la pression systolique, puis relâché 4 à 5 minutes plus tard, induisant ainsi une hyperhémie réactionnelle dans l'artère brachiale et donc une FMD qui résulte d'une libération locale de NO. La mesure de la dilatation endothélium-dépendante de l'artère brachiale se fait sur le plan longitudinal une minute après le



relâchement du brassard grâce à un scanner ultrasons à haute résolution. L'imagerie par ultrasons de l'artère brachiale doit se faire avec une sonde linéaire haute fréquence, d'au moins 7 MHz, 2 à 3 cm au-dessus du pli du coude. Toutes les images devraient être enregistrées en fin de diastole. Le pourcentage de différence entre le diamètre à l'état basal et celui mesuré suite à l'hyperhémie réactionnelle est calculé comme ceci :

$$\text{FMD} = [(\text{diamètre suite à l'hyperhémie réactionnelle} - \text{diamètre basal}) / \text{diamètre basal}] \times 100$$



Figure 10 : Positionnement de la sonde à ultrasons et du brassard pour la mesure de la FMD de l'artère brachiale (deanfield 2007).

Une augmentation du diamètre de l'artère brachiale chez le sujet sain se situe entre 7 et 10%, mais il existe une large gamme de valeurs pour le sujet sain, allant de 2 à 19% (Moens 2005, Pyke 2005). Les résultats obtenus peuvent être comparés à la réponse vasodilatatrice indépendante de l'endothélium par l'administration sublinguale de nitroglycérine (Korkmaz 2008).

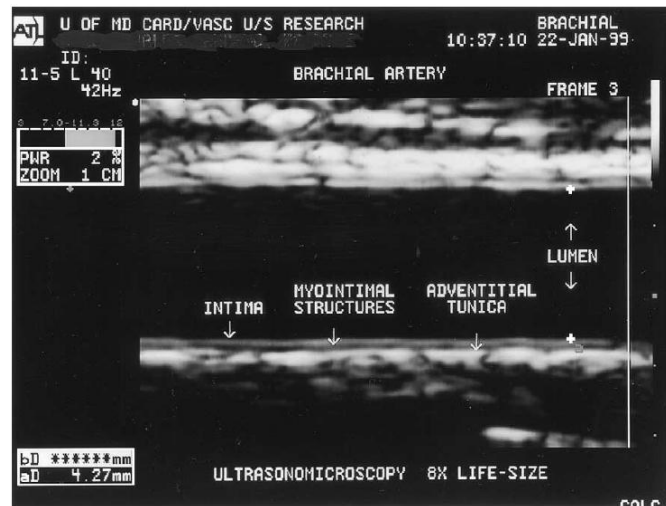


Figure 11 : Image ultrasonore longitudinale de l'artère brachiale obtenue avec une sonde à une fréquence de 11 MHz, et observée à un grossissement 8x (Corretti 2002).

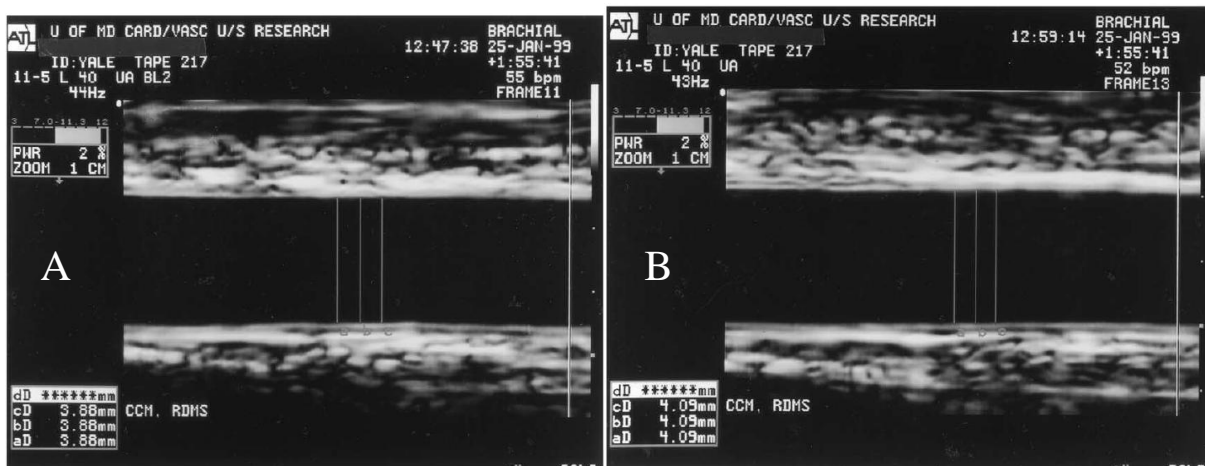


Figure 12 : Image ultrasonore de l'artère brachiale (A) au repos et (B) une minute après le stimulus hyperhémique. Les valeurs en bas à gauche des images donnent les mesures de la lumière du vaisseau (Corretti 2002).

La méthodologie de cette technique est très importante puisque des variations dans l'application du protocole peuvent avoir des répercussions importantes sur les résultats. Les critères importants comprennent le positionnement du brassard, la durée de l'ischémie, la qualité du matériel, l'environnement, l'exercice, les repas et notamment les repas gras, la prise de caféine, la température, le moment de la journée, les cycles menstruels. Les manipulateurs doivent aussi être rigoureusement entraînés, puisque les mesures sont fortement dépendantes de l'opérateur, en plus de la physiologie et de l'équipement, ce qui peut fortement influencer

la reproductibilité des résultats. Enfin, il n'existe pas de protocole clinique standard (Corretti 2002, Deanfield 2007).

L'étude de la FMD est fortement corrélée avec le risque de développer une pathologie cardiovasculaire, et peut prédire les conséquences d'une insuffisance cardiaque chronique (Meyer 2005). L'étude Framingham chez des patients avec des pathologies cardiovasculaires connues a montré des réponses vasodilatatrices de 3.3% chez les femmes et 2.4% chez les hommes, avec des valeurs allant de 0 à 5% (Benjamin 2004). La mesure de la fonction endothéliale par cette méthode se fait sur une grande artère, mais il a été montré que les résultats sont significativement en relation avec la dysfonction endothéliale des artères coronaires mise en évidence par angiographie (Anderson 1995b). Cet outil semble cependant plus adapté actuellement aux études de population qu'aux diagnostics individuels, à la vue de sa très faible reproductibilité si les paramètres d'acquisition ne sont pas scrupuleusement contrôlés.

## ***2.2 Mesure non invasive de la perfusion du myocarde***

### **2.2.1 Imagerie de la perfusion du myocarde par résonance magnétique**

La plupart des études de la perfusion myocardique en imagerie par résonance magnétique (IRM) sont basées sur le premier passage d'un bolus de l'agent de contraste gadolinium-DTPA. Les interactions entre les électrons non appariés de gadolinium paramagnétique et les protons de l'eau à proximité résultent en une relaxation plus rapide des protons de l'eau. Ainsi, le gadolinium est détecté indirectement par l'intermédiaire de son effet sur la relaxation des protons. Les temps de relaxation T1 et T2 des protons de l'eau sont inversement proportionnels à la concentration locale en gadolinium (Weinmann 1984). Par conséquent, les zones correctement perfusées auront un T1 court et apparaîtront plus claires sur des images fortement pondérées pour T1, tandis que les régions qui sont hypoperfusées auront un T1 plus long et seront mises en évidence par un signal plus faible. Le T1 du myocarde est affecté par plusieurs facteurs, y compris la fraction d'extraction de l'agent de contraste ainsi que

l'échange d'eau entre les espaces intravasculaires, extravasculaires et extracellulaires. La fraction d'extraction est généralement de 0,5 à 0,6 pour les agents de contraste extracellulaires, extravasculaires, qui sont de petites molécules qui diffusent librement hors de l'espace vasculaire (Gould 1982). La quantification de la perfusion myocardique est possible par des méthodes qui prennent en compte ces facteurs. Des agents de contraste intravasculaires ont été développés et appliqués à l'imagerie de la perfusion du myocarde (Jerosch-Herold 1999). Ces agents sont généralement confinés dans l'espace intravasculaire en raison de leur grande taille et ont une plus grande relaxivité (Saeed 2000).

L'IRM de la perfusion au stress est généralement appliquée dans le cadre d'une étude globale qui évalue la fonction ventriculaire, la perfusion au repos et au stress, et la viabilité ou l'infarctus du myocarde. Deux approches sont réalisées successivement après l'injection de l'agent de contraste au repos. La première repose sur l'étude de la perfusion au cours du premier passage de l'agent de contraste après une injection en bolus et permet de déterminer la perfusion tissulaire du myocarde. La seconde, l'imagerie du rehaussement tardif, est réalisée plus tardivement après l'injection de l'agent de contraste et permet de mettre en évidence une anomalie de la cinétique d'élimination de l'agent de contraste. L'étude totale prend généralement environ 45 à 60 minutes dans les centres expérimentés. Pour effectuer la quantification de la perfusion, la fonction d'entrée artérielle au repos et au stress doit également être déterminée. La haute résolution spatiale de l'IRM permettant la détection de l'ischémie sous-endocardique, les images peuvent être évaluées de façon qualitative en utilisant l'analyse visuelle. Klem et coll. ont rapporté une méthode avec une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection de la maladie coronaire, de 89% et 87%, respectivement (Klem 2006). Les images peuvent également être analysées en utilisant une approche semi-quantitative en utilisant les courbes de l'intensité du signal en fonction du temps lors du premier passage du signal à travers le myocarde. La quantification de la perfusion myocardique absolue peut aussi être obtenue à partir des courbes de l'intensité du signal en fonction du temps de la fonction d'entrée artérielle du myocarde par déconvolution (Wilke 1997).

Des critères établis pour l'IRM fournissent les directives pour l'usage approprié de l'IRM de perfusion et le test de stress (Hendel 2006). L'IRM cardiaque au stress par adénosine a été démontrée à la fois sensible et spécifique pour la détection de la maladie coronaire. Une méta-analyse incluant 1516 patients avec un risque intermédiaire de pathologie (prévalence 57,4%)

a montré par IRM cardiaque au stress par adénosine une sensibilité de 91% et une spécificité de 81% (Nandalur 2007). Comme la perfusion par IRM est une modalité encore relativement nouvelle, il y a moins de données pronostiques en comparaison avec les autres méthodes. Dans une étude de 420 patients atteints ou soupçonnés de maladie coronaire, la présence de perfusion anormale a été associée à un taux d'événements de 17%, alors qu'une perfusion normale a été associée à un taux d'événement de 5% (Bodi 2007). Dans une étude de 135 patients présentant une douleur thoracique et une troponine-I négative, il n'y avait pas d'événement à 1 an chez les 107 patients sans anomalies de perfusion par IRM, et la présence d'une image de stress anormale par IRM était significativement prédictive d'un événement cardiovasculaire grave (Ingkanisorn 2006). La réserve de perfusion absolue obtenue en IRM est fortement corrélée avec les valeurs obtenues en imagerie PET (Fritz-Hansen 2008). La perfusion par IRM a également montré une corrélation avec la réserve de débit fractionnaire (Rieber 2006).

Un examen par IRM avec un agent de contraste permet d'obtenir des informations sur la structure et la fonction du myocarde, comme la viabilité du myocarde, la perfusion à l'effort, la contractilité, la fraction d'éjection, ou encore le volume. Il faut cependant noter qu'un examen de la perfusion par IRM nécessite un temps d'imagerie de plus de 45 minutes, alors que les mêmes informations peuvent être obtenues par imagerie SPECT en 3 minutes. Les séquences d'impulsions actuelles souffrent d'un artefact "dark-rim" qui peut être confondu avec une perfusion anormale (Kellman 2007). L'origine de cet artefact est probablement multifactorielle, avec le mouvement du myocarde lors de l'acquisition de données, le phénomène de Gibbs par des contraintes de résolution, ou des artefacts par le passage des agents de contraste (Schreiber 2002, Storey 2002, Di Bella 2005). Par rapport à une vraie anomalie de perfusion, cet artefact tend à être présent de façon transitoire au pic d'augmentation du ventricule gauche. Parce que l'imagerie se produit pendant le premier passage d'un agent de contraste, l'imagerie de perfusion par IRM est plus compatible avec les tests de stress vasodilatateurs pharmacologiques. Cependant, pour de multiples raisons, le gadolinium-DTPA n'est pas un agent de contraste idéal. Il a une fraction d'extraction basse qui est de 50% lors de l'imagerie du premier passage, et une non-linéarité dans la relation entre l'intensité du signal et la perfusion. Dans les régions de l'infarctus, le gadolinium a une clairance lente qui change l'intensité du signal de référence pour l'étude de la perfusion au repos, mais la combinaison de la perfusion avec l'imagerie du rehaussement tardif permet une détection précise de l'infarctus du myocarde (Salerno 2009). Récemment, les agents de

contraste au gadolinium ont été associés à une maladie rare mais grave appelée fibrose systémique néphrogénique, qui survient principalement chez des patients avec des réductions significatives de la clairance de la créatinine (Prasad 2008).

### **2.2.2 Echocardiographie de contraste**

Bien que l'échocardiographie pour l'évaluation des mouvements de la paroi à l'exercice ou sous dobutamine soit couramment utilisée en clinique, les limites de la sensibilité de l'analyse des mouvements de la paroi ont mené à l'élaboration de techniques d'échographie de contraste du myocarde (ECM) pour évaluer la perfusion.

Les agents de contraste pour l'ECM sont des micro-bulles remplies de gaz (<10  $\mu\text{m}$ ) qui se compriment et s'élargissent lorsqu'elles sont exposées à un champ acoustique, et génèrent une forte rétrodiffusion acoustique (Dayton 1999). Pour certaines pressions acoustiques elles subissent des oscillations non linéaires qui résultent dans la production de fréquences harmoniques qui peuvent être utilisées pour distinguer le signal des microbulles par rapport au tissu environnant. Cela constitue la base des différentes techniques d'ECM (Bhatia 2008). Les caractéristiques ultrasonores des bulles sont liées à la fois à la composition de la capsule et au gaz encapsulé. Les microbulles restent intravasculaires puisqu'elles traversent le lit capillaire du myocarde et n'affectent pas l'hémodynamique cardiaque. Elles reflètent donc directement le flux sanguin du myocarde (Jayaweera 1994). La nature intravasculaire de ces agents de contraste est différente de la captation cellulaire des radionucléotides SPECT et de la diffusion extravasculaire de la plupart des agents de contraste en IRM. Les microbulles doivent être suffisamment stables pour résister à la destruction par des ultrasons de puissance normale pour pouvoir obtenir des concentrations suffisantes pour l'imagerie, mais elles doivent aussi avoir la capacité de se rompre sous l'action d'ultrasons à indice mécanique élevé pour permettre de mesurer la perfusion du myocarde dans certaines circonstances (Wei 1998).

La perfusion myocardique peut être évaluée avec une perfusion continue de microbulles. Lorsque la concentration des microbulles a atteint un état d'équilibre, une impulsion à indice mécanique élevé est utilisée pour détruire les bulles dans le plan de l'image. La reconstitution

ultérieure des microbulles est liée à la perfusion myocardique. Les zones qui sont hypoperfusées auront un retour plus lent de microbulles, tandis que les zones qui sont bien perfusées auront un retour plus rapide des microbulles. Après l'impulsion à indice mécanique élevé, les images peuvent être obtenues en mode intermittent couplé aux impulsions à indice mécanique élevé (Wei 1998) ou dans un mode en temps réel avec un faible indice mécanique (Tiemann 1999). L'avantage du mode intermittent est une augmentation du rapport signal sur bruit, mais la destruction du produit de contraste empêche l'imagerie en continu et donc le mouvement des parois ne peut être évalué en même temps. La technique en temps réel permet une évaluation simultanée des mouvements des parois et de la perfusion, mais la sensibilité de détection des microbulles est plus faible (Dijkmans 2006).

Les études d'ECM peuvent être analysées qualitativement ou quantitativement. L'analyse qualitative est effectuée par la recherche d'anomalies dans le taux de la reconstitution en produit de contraste à la suite des impulsions à indice mécanique élevé (Dijkmans 2006). L'analyse quantitative implique l'ajustement des paramètres aux courbes de l'intensité de la reconstitution en microbulles en fonction du temps. Le taux de réapparition des microbulles est lié à la vitesse du flux sanguin myocardique, et la valeur du plateau est liée à l'aire de la section transversale des microvaisseaux. Un indice du débit sanguin myocardique est le produit de ces deux paramètres (Wei 1998). Le débit sanguin absolu du myocarde peut également être déterminé avec une connaissance du volume sanguin du myocarde, qui peut être évalué comme étant le rapport entre l'intensité du signal du myocarde et la cavité ventriculaire gauche, ce qui a démontré une bonne corrélation avec le débit sanguin évalué en PET (Vogel 2005).

Des études ont démontré une forte concordance entre l'échographie de stress et l'étude de la perfusion en imagerie SPECT (Kaul 1997, Lipiec 2008). Une méta-analyse de 9 études, incluant 588 patients et comparant la SPECT avec la perfusion en échocardiographie de stress, a révélé une concordance moyenne de 81% (Bhatia 2008). De multiples études ont également démontré une précision comparable à la SPECT pour le diagnostic des CAD. La sensibilité et la spécificité de l'ECM à partir d'une méta-analyse de 18 études, incluant 1088 patients, a démontré une sensibilité de 82% et une spécificité de 80% (Bhatia 2008). Dans une étude rétrospective de 788 patients, l'ECM a montré une valeur pronostique ajoutée à la fraction d'éjection du ventricule gauche (Tsutsui 2005).

L'étude de la perfusion par ECM a un certain nombre d'avantages potentiels par rapport aux autres modalités. Par rapport à la SPECT et la PET, elle n'implique pas de rayonnements ionisants. Par rapport à la SPECT, l'ECM a une meilleure résolution spatiale, permettant la détection de l'ischémie sous-endocardique. L'ECM a également la possibilité d'effectuer la quantification du débit sanguin absolu du myocarde. L'imagerie peut être effectuée au cours d'un stress pharmacologique utilisant des agents inotropes ou vasodilatateurs, ou au cours de l'exercice (Shimoni 2001). Les avantages pratiques de l'échocardiographie comprennent notamment sa grande disponibilité et son coût relativement faible. La technique a cependant des limites. Des images sous-optimales sont obtenues dans un nombre significatif de patients, ce qui peut être causé par les mouvements respiratoires, la morphologie, ou une pathologie pulmonaire (Mulvagh 2008). L'atténuation des microbulles peut provoquer des artefacts dans la partie basale du ventricule gauche. Ces facteurs peuvent limiter la qualité d'image et l'empêcher de couvrir l'ensemble du ventricule, ce qui augmente la variabilité et diminue la reproductibilité. En outre, il existe certains facteurs dépendants de l'opérateur, comme le maintien d'un plan constant de l'image au cours de la reconstitution des microbulles. Enfin, bien que les agents de contraste ultrasonores sont généralement considérés comme sûrs (Wei 2008), la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis a émis un avertissement pour Definity et Optison, qui, après une révision de 2008, recommande une surveillance intensive des patients atteints d'hypertension pulmonaire ou d'instabilité cardio-pulmonaire, et une observation attentive des autres patients. Actuellement il n'y a pas d'agent de contraste ultrasonore approuvé pour l'imagerie de perfusion par ECM aux Etats-Unis, et la FDA considère qu'il s'agit d'une procédure expérimentale (Mulvagh 2008, Salerno 2009).

### **2.2.3 Mesure de la perfusion du myocarde en médecine nucléaire**

La scintigraphie de la perfusion du myocarde a été développée dans les années 1970 et a été depuis de plus en plus utilisée en cardiologie clinique (Underwood 2004). Après une injection intraveineuse, les produits radiopharmaceutiques utilisés pour la scintigraphie de la perfusion du myocarde (comme le  $^{201}\text{Thallium}$  et le  $^{99\text{m}}\text{Technétium-MIBI}$ ) sont extraits par les cardiomyocytes en fonction du débit sanguin régional du myocarde, et permettent donc d'évaluer la perfusion régionale, l'étendue et la gravité de l'ischémie, et la viabilité du myocarde. Outre sa capacité de diagnostic, il a été plusieurs fois démontré que la scintigraphie



de la perfusion du myocarde est un puissant facteur prédictif de futurs accidents coronariens dans le cadre d'un grand nombre d'études et dans diverses populations, notamment chez les patients diabétiques (Brown 1991, Brown 1996, Gould 2005, Vanzetto 2007). Les variables les plus importantes influant le pronostic sont l'étendue et la gravité de l'ischémie inductible (Ladenheim 1986), mais on trouve aussi d'autres indices prédictifs comme l'augmentation de la captation pulmonaire de  $^{201}\text{Tl}$  (Gill 1987), la dilatation ventriculaire à l'effort (Weiss 1987) et la fraction d'éjection ventriculaire (Gioia 1996, Johnson 1997). Les marqueurs de la dysfonction ventriculaire gauche ont tendance à prédire la mortalité cardiaque alors que l'ischémie inductible prédit les syndromes coronariens aigus (Hachamovitch 1998, Sharir 2001). La scintigraphie de la perfusion du myocarde apporte une valeur pronostique supplémentaire par rapport à l'examen clinique, l'électrocardiographie à l'effort et la coronarographie (Iskandrian 1993), puisque les patients avec une scintigraphie de la perfusion du myocarde anormale ont un taux élevé d'événements majeurs (6,7% par an), alors qu'une scintigraphie de la perfusion du myocarde normale indique un bon pronostic clinique. La tomographie par émission monophotonique (SPECT) est aujourd'hui la technique d'imagerie nucléaire la plus largement utilisée pour évaluer la perfusion myocardique en routine, tandis que la tomographie par émission de positons (PET) est principalement réservée à des fins de recherche. En effet, bien que l'imagerie PET soit utilisée pour l'étude de la perfusion du myocarde depuis plus de 25 ans, de multiples facteurs, y compris la disponibilité des caméras, une augmentation des coûts, et des questions de remboursement des soins ont limité l'application clinique généralisée de l'imagerie PET (Di Carli 2006).

### ***2.2.3.1 Principaux traceurs radioactifs du débit sanguin coronaire utilisés dans l'étude la maladie coronaire***

#### **2.2.3.1.1 Thallium 201**

Le thallium 201 ( $^{201}\text{Tl}$ ) est un élément métallique du groupe III-A de la table périodique des éléments, utilisé en imagerie SPECT de la perfusion. Le  $^{201}\text{Tl}$  est fourni sous forme de chlorure de thallium dans une solution isotonique avec une concentration qui est généralement de 1 mCi/mL. Il est généré dans un cyclotron et doit être livré à partir d'une radiopharmacie. Cet agent se désintègre par capture électronique en mercure  $^{201}\text{Hg}$ , et ce sont les rayons X de

basse énergie (75 à 80 keV) issus de cette désintégration qui sont détectés au cours de l'imagerie SPECT permettant l'imagerie avec des collimateurs à haute résolution et basse énergie. L'exposition aux radiations de l'ensemble du corps humain après une dose clinique typique (2 à 4 mCi) est d'environ 6,8 mSv, et les reins sont les organes les plus exposés aux radiations. La longue demi-vie physique (73 heures) contribue à un temps de séjour important des patients hospitalisés et nécessite des doses plus faibles pour minimiser les risques d'exposition aux rayonnements. L'émission de basse énergie nécessite des temps d'imagerie plus longs et aboutit à une atténuation plus importante de l'image, en particulier chez les patients obèses.

Les agents radioactifs pour évaluer la perfusion sont administrés par voie intraveineuse dans une grande veine du pli du coude alors que le patient est au repos ou à l'effort. Une seule injection de  $^{201}\text{Tl}$  est administrée et suivie presque immédiatement (dans les 10 à 15 minutes) par une première étude d'imagerie. L'administration de  $^{201}\text{Tl}$  doit être effectuée à proximité de l'équipement d'imagerie, puisqu'un retard réduirait la précision de l'imagerie. Une seconde série d'imagerie est effectuée 2 à 4 heures plus tard. Dans l'ensemble, une étude à base de  $^{201}\text{Tl}$  nécessite au moins 4 heures consécutives pour le patient et elle ne peut être séparée en sessions de plusieurs jours (Beller 2004, Baggish 2008). Les images SPECT de la perfusion peuvent être analysées qualitativement par analyse visuelle ou semi-quantitative en utilisant les différences relatives des valeurs entre le repos et le stress par rapport aux bases de données normales.

Le  $^{201}\text{Tl}$  est un analogue du potassium qui est extrait activement par les pompes membranaires NaK-ATPases lors du premier passage dans le système vasculaire coronaire. La captation initiale de  $^{201}\text{Tl}$  par le myocarde, après injection par voie intraveineuse, dépend à la fois du débit sanguin myocardique et de la fraction d'extraction du myocarde pour le  $^{201}\text{Tl}$  (Strauss 1975, Weich 1977). Il possède le plus haut coefficient d'extraction du myocarde en conditions basales (85%) parmi les radiotraceurs disponibles en imagerie SPECT de la perfusion, et le pic de concentration myocardique est atteint à 10 minutes après l'injection. Le  $^{201}\text{Tl}$  est rapidement éliminé du sang, avec une courbe bi-exponentielle (92% dans les 5 minutes ; demi-vie intravasculaire de 40 heures pour les 8% restants). Le  $^{201}\text{Tl}$  se localise aussi dans les adénomes de la parathyroïde et de la thyroïde et d'autres domaines avec une néoplasie active. Il ne se concentre pas de façon sélective au sein du système hépatobiliaire. Ce n'est que lorsque des blessures irréversibles du sarcolemme se produisent que le  $^{201}\text{Tl}$  ne peut pas être

piégé par les myocytes et la concentration intracellulaire initiale de  $^{201}\text{Tl}$  dans la zone ischémique est nettement diminuée. Cela constitue la base de l'imagerie au repos du  $^{201}\text{Tl}$  pour la détermination clinique de la viabilité du myocarde chez les patients coronariens avec une dysfonction ventriculaire gauche sévère. La captation du  $^{201}\text{Tl}$ , comme celle des autres traceurs pour l'imagerie de perfusion, n'est pas linéaire par rapport au débit sanguin du myocarde lorsque le flux augmente dans la gamme hyperémique. Lorsque le débit augmente, le traceur passe à travers le réseau capillaire sans être extrait et l'extraction atteint un plateau à un certain niveau de haut débit. À des débits élevés, des traceurs tels que  $^{201}\text{Tl}$  sous-estiment le débit réel. L'atténuation de la captation du  $^{201}\text{Tl}$  commence cependant à des débits plus élevés que d'autres traceurs tels que le technétium 99m sestamibi ou le rubidium 82, où le plateau se produit à un niveau inférieur en raison des flux d'extraction inférieurs lors du premier passage (Beller 2004).

Parce que le  $^{201}\text{Tl}$  se concentre essentiellement dans l'espace intracellulaire, il a une longue demi-vie biologique de 2,4 jours et est excrété dans l'urine et aussi les selles. Une caractéristique majeure du  $^{201}\text{Tl}$ , qui ne se retrouve pas chez les autres radiotraceurs de la perfusion, concerne ses propriétés de redistribution. Le  $^{201}\text{Tl}$  n'est pas séquestré de manière permanente dans le tissu responsable de sa captation initiale, et il est constamment échangé entre les espaces extracellulaires et intracellulaires. L'ampleur et la rapidité de ces échanges sont variables et dépendent du degré de la circulation sanguine de la région d'intérêt, qui peut aboutir à l'atténuation des différences de perfusion à l'effort en 20 à 30 minutes. Avec la restauration de la perfusion normale et la résolution de l'ischémie, les concentrations de  $^{201}\text{Tl}$  dans les cellules du myocarde augmentent au cours du temps, ce qui serait en corrélation avec la disparition d'un défaut transitoire. Pour cette raison, l'imagerie doit commencer dans les 10 à 15 minutes après l'injection à l'effort maximal. Une seconde série d'imagerie pour l'étude de la redistribution du  $^{201}\text{Tl}$ , à l'équilibre, offre un reflet de la perfusion au repos et de la viabilité du myocarde. Cette seconde série d'imagerie est généralement effectuée 2 à 4 heures après l'injection initiale. La différenciation entre l'ischémie et la cicatrice a été renforcée avec l'imagerie par réinjection de  $^{201}\text{Tl}$ , dans laquelle une seconde dose de  $^{201}\text{Tl}$  est donnée au repos après l'acquisition de la redistribution suivant les images à l'effort (Dilsizian 1990). Environ 30% à 40% de défauts fixes montrent visuellement une captation améliorée du  $^{201}\text{Tl}$  après la réinjection. Cette capacité unique de redistribution du  $^{201}\text{Tl}$  est à la base de l'une des techniques les plus sensibles permettant d'évaluer de manière non invasive la viabilité du myocarde chez les patients avec des cardiomyopathies ischémiques et le place en gold standard dans l'évaluation de viabilité des tissus.

### 2.2.3.1.2 Technétium-MIBI

Le technétium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sestamibi est un radiotracer utilisé en imagerie SPECT de la perfusion. Le  $^{99m}\text{Tc}$  est élué à partir du molybdène  $^{99m}\text{Mo}$  dans un générateur. Il se désintègre par transition isomérique avec une demi-vie physique de 6 heures. La demi-vie relativement courte du  $^{99m}\text{Tc}$  permet l'administration d'une dose de radiopharmaceutiques 10 à 15 fois supérieure à celle du  $^{201}\text{Tl}$  tout en conservant une dosimétrie favorable pour les patients. Les émissions de rayons gamma sont à un niveau d'énergie de 141 keV. Les agents de perfusion myocardique marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  fournissent une meilleure qualité d'image que le  $^{201}\text{Tl}$  car le pic d'énergie des photons à 140keV du  $^{99m}\text{Tc}$  est optimal pour l'imagerie avec une gamma-caméra (Kailasnath 2001). Le taux de comptage plus élevé pour les agents marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  permet facilement de coupler l'acquisition pour l'évaluation du mouvement des parois régionales ou de l'épaississement régional. L'organe qui reçoit l'exposition aux radiations la plus importante après l'injection d'un radiotracer de la perfusion au  $^{99m}\text{Tc}$  est la vésicule biliaire. Les radiations totales sur l'ensemble du corps après une dose typique (10 à 25 mCi) sont d'environ 5 mSv. Le  $^{99m}\text{Tc}$  libre diffuse dans l'eau corporelle totale et n'est pas extrait sélectivement dans le myocarde. Ainsi, pour que le  $^{99m}\text{Tc}$  soit un indicateur du débit sanguin coronaire, il doit être lié à un autre composé (comme le sestamibi) qui se concentre sélectivement dans le myocarde. Le processus de marquage pour le sestamibi est complexe et nécessite un processus de contrôle de qualité après la préparation qui implique une chromatographie.

Les agents marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  nécessitent 2 injections. Les injections peuvent se faire sur deux jours distincts, mais il est peu pratique pour le patient d'avoir à venir au laboratoire 2 jours. Pour cette raison, la plupart des laboratoires effectuent un protocole le même jour, avec les injections de repos et d'effort suivies par les imageries respectives. En général, la première injection est administrée chez le patient au repos, et l'imagerie est réalisée 30 à 60 minutes plus tard. Une deuxième injection à une dose 2 à 3 fois plus élevée est ensuite administrée pendant l'exercice ou l'effort pharmacologique, et l'imagerie est de nouveau effectuée. Une dose plus élevée est nécessaire pour surmonter la première injection et optimiser la qualité de l'image. Comme indiqué précédemment, les agents de perfusion marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  n'ont pas de capacité de redistribution, ce qui conduit à un long temps de séjour dans le myocarde. Ceci permet de ralentir, de réfléchir ou bien de répéter l'acquisition des images si nécessaire et offre une certaine souplesse de temps après l'injection, ce qui permet une séparation physique

entre l'équipement nécessaire à l'exercice et celui d'imagerie (Baggish 2008, Beller 2004). Comme pour le thallium, les images SPECT de la perfusion obtenues avec le  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi peuvent être analysées qualitativement par analyse visuelle ou semi-quantitative en utilisant les différences relatives des valeurs entre le repos et le stress.

Le sestamibi est un composé solide non radioactif qui peut être lié au  $^{99m}\text{Tc}$ , et doit être utilisé dans les 6 heures suivant la préparation. Le sestamibi est un traceur cationique qui diffuse dans les cellules sans captation active. Lorsque le  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi est administré dans les conditions basales, il est capté dans le myocarde en proportion du débit sanguin myocardique régional. Quand il est administré à des débits d'au moins 2 à 2,5 ml/min/g, l'extraction atteint un plateau (Glover 1990, Glover 1995). Son coefficient d'extraction (55 à 65%) est nettement inférieur à celui du thallium, et le plateau est atteint à un niveau inférieur d'augmentation du débit sanguin par rapport au  $^{201}\text{Tl}$ . Le sestamibi s'accumule dans les cellules du myocarde en se liant aux membranes de la mitochondrie, en raison du potentiel de membrane plus bas (plus négatif) par des interactions électrostatiques. Il est rapidement éliminé du sang (demi-vie de 4,3 minutes au repos et 1,6 minute à l'effort). Le passage intracellulaire du sestamibi est permanent, et il ne montre pratiquement aucune redistribution après la captation initiale. Par conséquent, des injections et des images au repos et à l'effort distinctes dans le temps sont nécessaires pour la détection de défauts de perfusion à l'effort qui sont réversibles. Quand les membranes mitochondriales sont dépolarisées, comme c'est le cas d'un dommage irréversible des myocytes, la captation du  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi est altérée (Piwnica-Worms 1990). Les interventions métaboliques qui blessent le sarcolemme ou les membranes mitochondriales résultent en une perte de la rétention cellulaire du  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi, et comme avec le  $^{201}\text{Tl}$ , la captation du  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi dépend de la viabilité myocardique, et la taille des défauts de captation est bien corrélée avec la taille de l'infarctus (Beanlands 1990, Beller 1993). Ainsi le  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi est un agent d'imagerie valable pour l'évaluation de la viabilité dans le contexte clinique.

La principale voie d'élimination du sestamibi est le système hépato-biliaire, avec une captation importante par le foie. A 5 minutes après l'injection chez un patient au repos, 1,2% de la dose administrée est dans le cœur, tandis que 20% se trouve dans le foie. Cette forte concentration hépatique peut entraîner une image importante du foie lors d'un examen SPECT avec une résolution cardiaque compromise. Un repas gras ou une boisson peut être utilisé pour accélérer la clairance hépatobiliaire du sestamibi et aidera la mobilité gastro-intestinale à éloigner l'activité du cœur. Cependant, il peut y avoir une activité intense dans le

côlon de nombreuses heures plus tard, en particulier chez les patients avec un angle gauche du côlon élevé, ce qui affecterait aussi l'imagerie du myocarde. Avec l'exercice, le flux sanguin splanchnique diminue, résultant en une captation splanchnique moins importante qu'au repos. Par conséquent, il est préférable de procéder à l'imagerie après une brève période d'attente pour permettre une certaine clairance hépatique et biliaire, mais avant une accumulation significative qui pourrait se produire dans le côlon transverse. En règle générale, l'imagerie commence 10 à 20 minutes après l'injection à l'effort maximal et 45 à 60 minutes après l'injection au repos ou à l'effort pharmacologique.

### **2.2.3.1.3 Rubidium 82**

Le rubidium 82 ( $^{82}\text{Rb}$ ) est un traceur utilisé en imagerie PET de la perfusion qui est partiellement extrait par le myocarde lors d'un transit capillaire simple. Il existe une relation inverse et non linéaire entre la fraction d'extraction et de flux (Goldstein 1983). Tout comme le  $^{201}\text{Tl}$ , le  $^{82}\text{Rb}$  est considéré comme un analogue du potassium et sa captation s'effectue activement par des transporteurs membranaires.

Le  $^{82}\text{Rb}$  de chlorure est un traceur intéressant parce qu'il est produit à partir d'un générateur de strontium et ne nécessite donc pas de cyclotron sur place. La demi-vie du strontium est de 26 jours, et la demi-vie du  $^{82}\text{Rb}$  est de 76 secondes. Le coefficient d'extraction au premier passage est de 60%. L'inconvénient est que le  $^{82}\text{Rb}$  a un roll-off de captation plus important que les autres traceurs cités et une dose plus élevée de rayonnement (souvent de 13 mSv). Parce que la captation absolue du  $^{82}\text{Rb}$  atteint son plateau à des débits dépassant 2 à 3 g/ml/min, la captation en flux hyperémiques est peu sensible aux variations de débit, même si ce roll-off est probablement cliniquement significatif. Il peut toutefois avoir des implications pour l'estimation quantitative des flux dans la gamme hyperémique. En outre, des études expérimentales ont démontré que l'ischémie et la reperfusion myocardique réduisent la captation du rubidium, non pas à cause de la diminution du débit, mais plutôt à cause de la réduction de la fraction d'extraction à la suite de la diminution des transporteurs cellulaires, et cela se produit même après de courtes périodes d'ischémie transitoire (Fukuyama 1978, Wilson 1987).

De la même façon que pour les images obtenues en SPECT, les images de perfusion par PET peuvent être analysées qualitativement et semi-quantitativement. Par ailleurs, il est possible de

quantifier la perfusion myocardique par un modèle à 2 compartiments, initialement décrit par Mullani et Gould (Mullani 1983) et Goldstein et coll. (Goldstein 1983). Lorsque les courbes d'activité en fonction du temps sont obtenues, une bonne précision a été démontrée sur une large plage de débits. Un problème avec le  $^{82}\text{Rb}$  est le bruit sur les courbes temps-activité, en raison de la courte demi-vie physique et donc du comptage absolu des données limité. De nouvelles techniques de réduction du bruit, comme l'approche par les ondelettes, ont été utilisées pour réduire le bruit des courbes du  $^{82}\text{Rb}$  (Lin 2001).

Le  $^{82}\text{Rb}$  a été largement utilisé pour l'évaluation clinique de la perfusion myocardique chez les patients atteints de CAD (Gould 1986, Go 1990, Stewart 1991, Simone 1992, Williams 1994) et est approuvé à cette fin par la FDA. En règle générale, 30 à 60 mCi sont administrés en perfusion à partir du système d'élution du générateur sur une période de 30 à 60 secondes. Après un intervalle de 1 à 3 minutes pour permettre la clairance du traceur dans le sang artériel, une image statique est obtenue sur une période de 3 à 7 minutes. Avec le vieillissement du générateur, le temps d'infusion devient plus long et la qualité d'image est quelque peu dégradée par l'activité des résidus sanguins. Une bonne corrélation a été faite en comparant la captation du  $^{82}\text{Rb}$  avec la sévérité de la coronaropathie et en démontrant l'amélioration de la perfusion après une angioplastie (Beller 2004).

### ***2.3 Conclusion sur les mesures de la dysfonction endothéliale et des altérations de la perfusion du myocarde***

L'observation de la vasomotricité dépendante de l'endothélium est un critère clinique important pour déterminer la fonction endothéliale. Une technique de mesure de la dysfonction endothéliale sur un plan individuel et pouvant être utilisée en routine clinique pourrait permettre de détecter de façon précoce la mise en place de pathologies cardiovasculaires. Les techniques de référence pour déterminer la fonction endothéliale sont cependant invasives, avec pour conséquence une application limitée à grande échelle et une incompatibilité avec des tests répétés sur un même individu. Actuellement, seule la FMD permet la mesure non invasive de l'altération de la vasodilatation, par l'observation de la réponse d'une grande artère à une augmentation du flux sanguin. Cette technique souffre

cependant d'une absence de protocole standard et d'une faible reproductibilité, ce qui limite son utilisation en routine clinique. Par ailleurs, plusieurs modalités d'imagerie clinique non invasives pourraient mettre en évidence les conséquences de la dysfonction endothéliale par l'observation de l'état de la perfusion. L'échocardiographie de contraste est une technique sans rayonnements ionisants qui pourrait être facilement disponible en routine, mais des images sous-optimales ont été obtenues sur de nombreux patients, et aucun produit de contraste permettant de faire état de la perfusion n'est actuellement disponible dans le commerce. L'IRM de contraste est une technique qui nécessite un temps d'imagerie beaucoup plus long qu'en imagerie SPECT, pour obtenir les mêmes informations, et le gadolinium-DTPA n'est pas un agent de contraste idéal. Finalement, l'imagerie nucléaire est une technique utilisant des rayonnements ionisants, mais qui présente l'avantage d'être rapide, pratiquée en routine clinique avec une procédure aisée, et de nombreux radiotraceurs sont disponibles pour l'imagerie des altérations de la perfusion.



### **3 Hétérogénéité de la perfusion du myocarde**

#### ***3.1 Hétérogénéité physiologique de la perfusion du myocarde***

L'hétérogénéité du flux sanguin myocardique à une échelle locale, sur des échantillons d'au moins 1% de la masse du ventricule gauche, a été mise en évidence pour la première fois au début des années 1970 (Yipintsoi 1973, Utley 1974), et a été par la suite grandement étudiée par Bassingthwaighe et coll. (King 1985, Bassingthwaighe 1989, Van Beek 1989, Bassingthwaighe 1999). Cette hétérogénéité est grandement dépendante de la résolution de l'observation, et les variations de flux augmentent lorsque la taille des échantillons diminue. L'observation de cette hétérogénéité spatiale du flux sanguin est en fait le reflet de la somme des variations temporelles, des variations méthodologiques, et enfin d'une réelle variation spatiale du flux. Toutefois, King et coll. ont démontré par l'utilisation de microsphères de 15 $\mu$ m dans des conditions normales avec des animaux éveillés que les variations temporelles et méthodologiques exprimées par le coefficient de variation (SD/moyenne) ne sont que de 10% chacune, tandis que le coefficient de variation spatial réel serait de l'ordre de 25% sur le ventricule gauche (King 1985). Cela peut sembler curieusement élevé. Après tout, le cœur est un organe mono-fonctionnel dans lequel les cellules forment un syncytium de telle sorte que toutes les cellules sont excitées et se contractent pour chaque battement du cœur. Pourtant, des microsphères marquées ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité de la perfusion du myocarde, avec des variations du flux sanguin, par gramme de tissu, de 6 à 10 fois à une résolution spatiale de 0.5% de la masse du ventricule gauche (King 1985, Deussen 1998, Bassingthwaighe 1999). En effet, même au sein des couches myocardiques d'un cœur sain, le flux peut varier de 20% à 250% du flux global moyen (Decking 1998). Cette hétérogénéité ne semble pourtant pas aléatoire, et pourrait suggérer une régulation hautement localisée (King 1985, Bassingthwaighe 1989). La structure hétérogène du flux est différente d'un animal à un autre, et aucune région identifiable n'a systématiquement le même flux plus élevé ou plus bas que la moyenne globale. Cependant, les régions avec des flux élevés ou bas sont stables dans le temps pour un même animal (King 1989). Ces résultats suggèrent que les régions sont stables dans leur flux sanguin, impliquant une stabilité dans la fonction. Par ailleurs, la plupart

des études suggèrent que le facteur le plus important est le tissu lui-même, le flux se modifiant pour s'accorder avec les besoins métaboliques. En effet, l'activité métabolique locale corrèle avec le flux régional (Groeneveld 1993, Decking 1998b, Van Beek 1999).

En résumé, dans un myocarde histologiquement homogène il existe une hétérogénéité spatiale du flux sanguin qui est stable dans le temps, dépendante de la résolution, dépendante en grande partie de la couche myocardique, non aléatoire et enfin liée au métabolisme aérobie local (Deussen 1998). Cependant, il se pourrait que cette hétérogénéité de la perfusion du myocarde augmente dans le cadre de pathologies cardiovasculaires impliquant une dysfonction endothéliale, comme décrit dans le chapitre 1.2 (Johnson 2005).

## ***3.2 Mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde***

### **3.2.1 Analyse fractale**

Dans les années 1960, le mathématicien Benoît Mandelbrot définissait l'adjectif « fractal » pour désigner des objets dont la géométrie complexe ne peut plus être caractérisée par une dimension entière. Les fractals sont considérés comme des objets auto-similaires. Cette propriété est très intéressante puisqu'elle signifie que le tout est semblable à une de ses parties (Lopes 2010). Par définition, l'autosimilarité rend compte de l'apparition des motifs de manière identique à des échelles différentes (Mandelbrot 1967). Ce concept est fréquemment rencontré dans différents domaines, comme la géologie, la biologie, la médecine ou encore la mécanique des fluides, et permet de donner une interprétation géométrique simple, étant largement utilisée dans des problèmes d'analyse d'image (Lopes 2010).

Les variations de flux sanguins du myocarde ne sont pas aléatoires, et il y a une corrélation des flux entre les régions voisines proches. Par la modélisation du débit sanguin du myocarde avec un arbre fractal de ramification dichotomique, des études ont démontré que le mode de ramification de l'arbre coronarien artériel sous-tend une distribution fractale de la perfusion (Bassingthwaite 1989, Van Beek 1989, Beard 2000). Van Bavel et Spaan ont modélisé le débit sanguin coronaire avec les données obtenues à partir de moulages vasculaires porcins et ont confirmé que la nature fractale de l'hétérogénéité du débit local est déterminée par la

structure de l'arbre coronaire (Van Bavel 1992). L'hypothèse selon laquelle l'anatomie vasculaire est responsable de la structure de la répartition de la perfusion myocardique est étayée par le fait qu'aucune grande variation de l'hétérogénéité spatiale de perfusion en fonction du temps n'a été décrite (King 1989, Deussen 1996).

L'hétérogénéité peut être décrite par la variance, l'écart type, ou par une mesure relative, comme la dispersion relative, RD. La RD est généralement utilisée comme une mesure de l'hétérogénéité de la perfusion. Elle est définie comme le rapport de l'écart type avec la moyenne des valeurs de débit de tous les échantillons d'organes ( $RD = SD / \text{moyenne}$ ), et est donc identique au coefficient de variation. Toutefois, la RD présente plusieurs inconvénients. Elle dépend notamment de la résolution spatiale de la mesure, et donc de la taille réelle de chaque échantillon : plus la résolution spatiale utilisée est fine, plus la variance apparente est grande. Puisque les mesures de perfusion cliniques ont normalement une résolution beaucoup plus faible que de nombreuses méthodes expérimentales, la RD ne peut pas être utilisée pour comparer l'hétérogénéité du débit sanguin des différentes études.

Par conséquent, Bassingthwaighte et coll. ont établi une relation empirique maintenant bien connue décrivant, dans certaines limites de la taille des échantillons, l'augmentation de la RD avec la diminution de la taille des échantillons :  $RD(m) = RD(m_{\text{ref}}) \cdot (m / m_{\text{ref}})^{1-D}$ , où  $m$  est le volume des échantillons de tissu utilisés pour calculer la RD et  $m_{\text{ref}}$  est un volume de référence choisi arbitrairement. La RD présente une autosimilarité sur l'échelle par rapport à la taille des échantillons. Cette équation représente une relation fractale et le paramètre  $D$ , qui est une mesure globale de l'hétérogénéité, est identifié comme une dimension fractale spatiale (Mandelbrot 1983, Bassingthwaighte 1994).

La dimension fractale  $D$ , une mesure de l'autosimilarité de données organisées dans l'espace, est couramment utilisée dans les études sur l'hétérogénéité de la perfusion.  $D$  peut varier de 1,0 à 1,5, en fonction de l'hétérogénéité du débit sanguin régional. Une valeur  $D$  de 1,0 indique une perfusion myocardique uniforme, alors qu'une valeur de 1,5 indique des valeurs de perfusion voisines non corrélées. La dimension fractale  $D$  est considérée comme un paramètre fiable pour l'évaluation indépendante de la répartition de la perfusion du cœur et d'autres organes. Pour l'hétérogénéité de la perfusion myocardique, une moyenne de  $D$  d'à peu près 1,2 à 1,25 a été mesurée, ce qui suggère que l'hétérogénéité n'est pas aléatoire: les flux dans les échantillons de tissus adjacents sont corrélés positivement, c'est à dire qu'ils ont

tendance à se ressembler (Bassingthwaighte 1989). Ce paramètre a été largement étudié en situation physiologique, mais la littérature présente encore de grandes lacunes dans l'évaluation de D pour les études physiopathologiques, ce qui peut limiter son application.

### **3.2.2 Analyse markovienne**

Comme nous l'avons vu précédemment, la dysfonction endothéliale des artères coronaires se réfère à une grande variété de physiopathologies vasomotrices associées à des accidents vasculaires pouvant impliquer les artères coronaires et plusieurs médiateurs vasoactifs dans le cadre de plusieurs manifestations physiopathologiques. Les stimuli, les médiateurs, et les réponses vasculaires des artères coronaires épocardiques et microvasculaires sont très différentes, voire divergentes. Une méthode d'analyse non invasive de l'ensemble de ces manifestations applicable en routine clinique présente donc un fort intérêt. LK. Gould et N. Johnson ont émis l'hypothèse qu'une hétérogénéité de la perfusion du myocarde observée visuellement en imagerie nucléaire au repos pourrait être une manifestation de cette dysfonction endothéliale globale de la microcirculation coronaire. Elle serait le reflet d'une vasoconstriction hétérogène des artères coronaires, provoquée par l'altération des voies de signalisation impliquant les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs dérivés de l'endothélium, comme nous l'avons détaillé dans le chapitre 1.2 (Johnson 2005).

En 2005, Johnson et Gould ont proposé un nouveau concept pour la mesure de l'hétérogénéité par une analyse markovienne d'images PET de la perfusion du myocarde, en démontrant une relation étroite entre l'hétérogénéité de la perfusion au repos et la maladie coronarienne à un stade précoce ou avancé (Johnson 2005). Une importante population de 1034 patients avait été analysée et comparée à un groupe de 50 patients sains. Par cette analyse markovienne, ils ont été en mesure de quantifier cette hétérogénéité globale des images de perfusion, et de mettre en évidence des différences significatives entre des images obtenues chez des patients et des images des patients à risque. Les données de Gould et Johnson indiquent que l'hétérogénéité de perfusion myocardique de repos est une manifestation du large spectre de comportements vasculaires coronaires qui est un puissant facteur prédictif d'accidents vasculaires, en plus des facteurs de risque standard.

L'analyse markovienne de l'hétérogénéité caractérise une image en examinant la probabilité qu'un pixel avec une intensité donnée aura un voisin avec une intensité différente. Pour cette étude, l'index d'hétérogénéité (index H ou HI), est donné pour l'ensemble de l'image de la perfusion du myocarde. L'index H peut avoir des valeurs comprises entre 0 (exclu) et 1 (inclus). Une valeur proche de 0 représente une image avec une forte probabilité que les pixels voisins aient des valeurs d'intensité très différentes, et donc un niveau élevé d'hétérogénéité. Inversement, une valeur proche de 1 représente une image avec une forte probabilité pour que les pixels voisins aient des valeurs d'intensité similaires, et représente donc un faible niveau d'hétérogénéité de l'image. Par un traitement préalable des images, l'index d'hétérogénéité n'est pas fortement influencé par des défauts de perfusion sévères, et par ailleurs, le calcul de l'index H est pondéré pour les petites différences d'intensité, et avec peu d'influence sur l'index pour de grandes différences d'intensité, pour diminuer l'influence de graves défauts de perfusion. En effet, la finalité de cet index n'est pas de mettre en évidence d'importants défauts de perfusion facilement observables, mais de révéler de faibles défauts de perfusion répartis sur l'ensemble du myocarde. Par conséquent, l'index d'hétérogénéité exprime par une valeur unique la probabilité des différences entre deux pixels voisins et permet de quantifier mathématiquement la notion intuitive d'hétérogénéité.

### ***3.3 Conclusion sur l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde***

Un myocarde sain et histologiquement homogène présente une hétérogénéité spatiale dans sa perfusion qui est stable dans le temps, dépendante de la résolution et non aléatoire. La découverte du caractère fractal de la perfusion du myocarde a permis la mise en place d'index pour quantifier la nature fractale de cette hétérogénéité. Cependant, ce paramètre a été largement étudié en situation physiologique, mais très peu de données sont disponibles pour une application à des études physiopathologiques, pour lesquelles il ne semble pas encore adapté. Il se pourrait que l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde sain augmente dans le cadre de pathologies cardiovasculaires impliquant une dysfonction endothéliale, et la quantification de cette hétérogénéité en routine clinique pourrait fournir un outil essentiel pour la détection précoce de la maladie coronarienne et la prise en charge de patients à risque.

Pour l'étude de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde en situation physiopathologique, l'analyse markovienne semble plus adaptée et plus aisée à mettre en place.

## Conclusion générale

Le rôle essentiel de l'endothélium par la production finement régulée de nombreux facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs permet la régulation du tonus et le maintien de l'intégrité des vaisseaux. Une dégradation de la biodisponibilité des facteurs vasodilatateurs ou une augmentation de la production des facteurs vasoconstricteurs peut causer l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Cette dysfonction endothéliale précède et se retrouve liée à de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire et peut fortement contribuer au développement de la plaque d'athérome.

Une technique de mesure non invasive de la dysfonction endothéliale sur un plan individuel et pouvant être utilisée en routine clinique présente donc un grand intérêt pour la détection précoce de pathologies cardiovasculaires. Cependant, aucun protocole standard n'existe pour la FMD, dont les résultats sont par ailleurs faiblement reproductifs, et aucun produit de contraste permettant de faire état de la perfusion n'est actuellement disponible dans le commerce pour l'échocardiographie de contraste. L'IRM de contraste est une technique qui nécessite beaucoup de temps, et le gadolinium-DTPA présente certains défauts. Enfin, l'imagerie nucléaire est une technique de routine clinique avec une procédure aisée, et l'imagerie des altérations de la perfusion est possible grâce à de nombreux radiotraceurs disponibles.

Par ailleurs, la dysfonction endothéliale pourrait se refléter par une hétérogénéité de la perfusion du myocarde en imagerie PET, et une analyse markovienne de ces images dans le cadre de pathologies cardiovasculaires a démontré que cette hétérogénéité pouvait être quantifiée en routine clinique. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur l'application de cette analyse en imagerie SPECT, ni sur son impact pronostique.

## **Seconde partie : Travail expérimental**



# 1 Etude clinique

L'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde a été démontrée comme étant un outil intéressant en imagerie clinique PET par Johnson et Gould en 2005. Cependant, aucune donnée n'est disponible quant à la capacité de mettre en évidence et de quantifier cette hétérogénéité de perfusion du myocarde en imagerie clinique SPECT, bien que cette dernière soit la technique d'imagerie nucléaire la plus utilisée en routine clinique, et de plus, que ce soit en imagerie PET ou SPECT, aucune donnée n'est disponible sur l'impact pronostique de l'index H sur une population de patients. L'objectif de l'ensemble de ce travail est de déterminer la faisabilité de l'application de l'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde à l'imagerie SPECT, par la comparaison d'une population de patients diabétiques par rapport à des sujets avec un faible niveau de facteurs de risque cardio-vasculaire et une faible probabilité de maladie coronarienne. En effet, comme nous l'avons vu dans les chapitres 1.2.2.5 et 3.2.3 de la revue bibliographique, la dysfonction endothéliale au sein du diabète a été largement démontrée de même que son impact sur le développement de la plaque d'athérome, et l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde observée visuellement en imagerie nucléaire au repos semble être une manifestation de cette dysfonction endothéliale globale de la microcirculation coronaire. Toutefois, lors de la reconstruction des images, un filtre est systématiquement utilisé pour homogénéiser les images et ainsi faciliter leur interprétation clinique. Evidemment, comme ce filtre modifie l'homogénéité de l'image, il pourrait donc grandement influencer l'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde. La première étude de ce travail propose donc de déterminer l'impact du filtre appliqué aux images cliniques pour la quantification de l'hétérogénéité de perfusion du myocarde en imagerie SPECT. Dans un second temps, l'étude clinique suivante appliquera les résultats obtenus, pour quantifier l'hétérogénéité de perfusion du myocarde en imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  chez des patients diabétiques issus d'une étude rétrospective avec un suivi complet, par rapport à des sujets avec un faible niveau de facteurs de risque cardio-vasculaire et une faible probabilité de maladie coronarienne, pour évaluer l'impact pronostique de l'index H.

## ***1.1 Etude clinique de l'influence du filtre sur l'analyse markovienne de la perfusion du myocarde en imagerie SPECT***

### **1.1.1 Introduction**

La première étude de ce travail propose d'évaluer la capacité de mettre en évidence et de quantifier l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde en imagerie clinique SPECT, et de déterminer l'impact du filtre appliqué aux images cliniques.

### **1.1.2 Méthode**

#### ***1.1.2.1 Sélection de la population***

Une population composée de patients diabétiques et de patients normaux, issue de la base de données récente du département de cardiologie nucléaire de l'hôpital universitaire de Grenoble (France), a été sélectionnée pour évaluer l'influence du filtre lors de la reconstruction des images sur l'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde, et ainsi déterminer les valeurs adéquates de filtre à utiliser pour les études ultérieures. Cette population est composée de 39 patients diabétiques et 21 patients normaux.

Les individus normaux présentent des douleurs thoraciques atypiques, une probabilité d'accident coronarien inférieure à 5% (basée sur l'âge et les facteurs de risque cardiovasculaire classiques, selon les critères Diamond et Forrester), et une perfusion du myocarde normale à l'issue de l'examen au  $^{201}\text{Tl}$ . Les patients des groupes diabétiques répondent aux critères suivants: âge inférieur à 85 ans, sans antécédent clinique de maladie coronaire, aucun des symptômes typiques d'angine de poitrine, et présentant plus de 3 indicateurs pronostiques cliniques classiques et biologiques sur 13. Tous les patients ont subi une imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  avec une épreuve d'effort ou une injection de dipyridamole.

### ***1.1.2.2 Protocole d'imagerie SPECT***

Les exercices de stress et l'imagerie SPECT ont été réalisés de façon identique selon les protocoles de routine utilisés au service de médecine nucléaire de Grenoble, comme décrit précédemment (Machecourt 1994, Vanzetto 2007). A la fin de l'effort, 2,5 mCi (92,5 MBq) de <sup>201</sup>Thallium sont injectés par voie intraveineuse, et les premières images couplées à l'ECG sont enregistrées 10 minutes plus tard. Trois heures après l'épreuve d'effort, 1 mCi (37,5 MBq) de <sup>201</sup>Thallium est injecté au repos avec une nouvelle acquisition couplée à l'ECG 15 minutes plus tard (imagerie de la reperfusion). Les images ont été acquises en utilisant une gamma-caméra à double tête, en rotation, avec une orbite circulaire à 180 ° (32 projections).

Pour cette population de patients, un pré-traitement uniforme a été appliqué pour la reconstruction des données brutes, et les images ont été reconstruites en utilisant 10 filtres Butterworth différents pour chaque acquisition, et réorientées pour obtenir des sections transaxiales du ventricule gauche selon les trois plans cardiaques standards (Sopha NXT, Sopha Medical, Paris, France). Afin d'évaluer le protocole de filtrage optimal pour mettre en évidence l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde et une différence potentielle de cette hétérogénéité entre les sujets diabétiques et les témoins, nous avons choisi 10 conditions de filtre Butterworth différentes, soit : 0.2/10, 0.2/20, 0.3/10, 0.3/20, 0.4/10, 0.4/20, 0.5/10, 0.5/20, 0.6/10, 0.6/20, les valeurs de cut-off et de roll-off respectivement des 10 conditions.

### ***1.1.2.3 Analyse des images***

Au cours de ce travail, il a été possible d'engager une collaboration avec le Dr. Nils Johnson, lequel nous a autorisé l'accès au programme originel d'analyse markovienne de l'hétérogénéité validé dans son étude de 2005 (Johnson 2005). L'analyse de nos images tomographiques SPECT a nécessité une adaptation du programme originel qui a été effectuée par le Dr. Nils Johnson.

Le traitement des images est réalisé grâce à un programme développé par le Dr. Nils Johnson sur le logiciel IDL (ITT Visual Information Solutions, United States). Un programme supplémentaire a été créé pour transformer le format dicom de nos images en un format

positron compatible avec son programme d'analyse. Ayant obtenu ce programme, le changement de format des images a pu ainsi intégralement s'effectuer au sein de notre laboratoire.

Suite à l'envoi de ces images au format positron, le Dr. Nils Johnson s'est chargé de créer les cartes topographiques de ces images. Un algorithme de reconstruction en 3-dimensions (3D) génère des vues petit axe et grand axe des images cardiaques acquises. À partir de profils circulaires, des vues topographiques 3D du ventricule gauche sont reconstruites montrant la distribution relative de l'activité régionale divisée en quadrants latéral, inférieur, septal et antérieur.

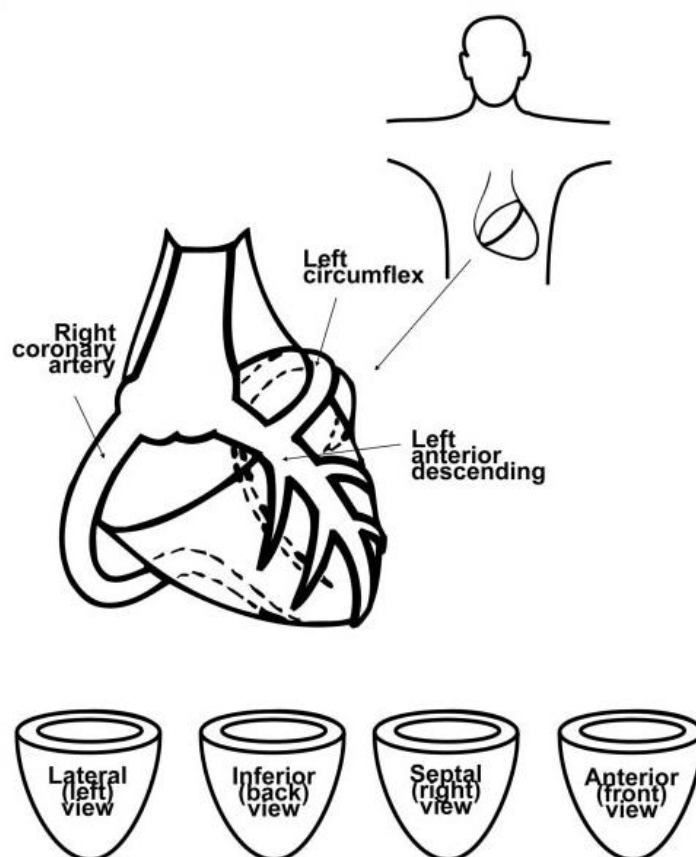


Figure 13 : Représentation schématique des quatre quadrants du cœur : Latéral, inférieur, septal et antérieur.

Chaque carte topographique est composée de 21 coupes le long du grand axe du ventricule gauche. Chaque coupe grand axe contient 64 pixels radiaux, ce qui représente un angle de  $360^\circ$ . Les 4 quadrants contiennent 16 pixels radiaux chacun. Par conséquent, la taille absolue du pixel est de  $N\text{-par-M}$ , où  $N$  est le  $1/21$  de la distance de la base à l'apex (différent pour chaque patient) et  $M$  est de  $360^\circ/64$  (identique pour chaque patient).

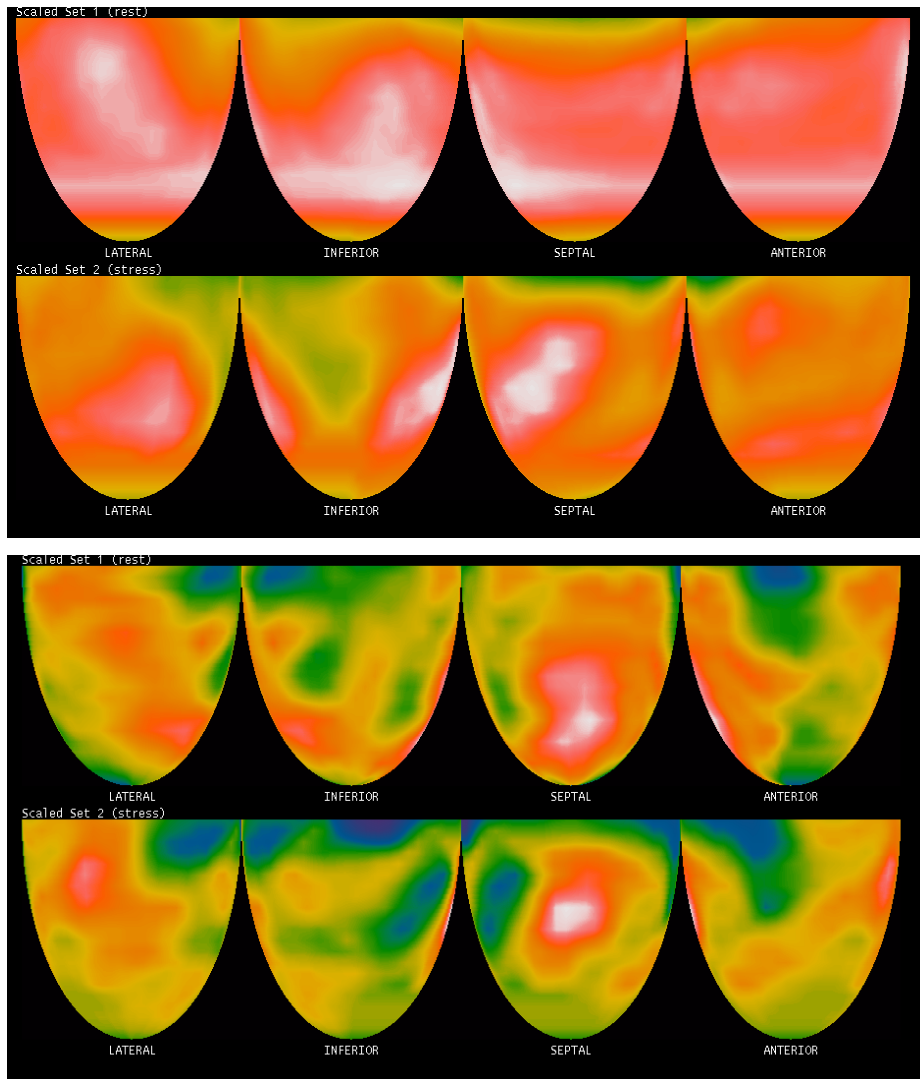


Figure 14 : Exemples de carte topographique obtenue à partir d'images de perfusion cardiaque cliniques SPECT grâce au programme de Nils Johnson.

Enfin, au retour de ces cartes, nous appliquons la méthode d'analyse markovienne et nous déterminons l'index H pour chacune des images grâce au programme originel.

L'analyse markovienne de l'hétérogénéité caractérise une image en examinant la probabilité qu'un pixel avec une intensité donnée aura un voisin avec une intensité différente (Johnson 2005), où  $P_d(m)$  est la probabilité que 2 pixels adjacents ont des valeurs qui diffèrent d'une intensité  $m$ . Pour cette étude, l'index d'hétérogénéité (index H ou HI) est donné par l'équation:

$$HI = \sum m [1 / (1 + m)^2] P_d(m).$$

L'index H peut avoir des valeurs comprises entre 0 (exclu) et 1 (inclus). Une valeur proche de 0 représente une image avec une forte probabilité que les pixels voisins aient des valeurs d'intensité très différentes, et donc un niveau élevé d'hétérogénéité. Inversement, une valeur proche de 1 représente une image avec une forte probabilité pour que les pixels voisins aient des valeurs d'intensité similaires, et représente donc un faible niveau d'hétérogénéité de l'image. L'index H permet donc de quantifier mathématiquement la notion intuitive d'hétérogénéité.

Comme nous venons de le voir, la répartition du traceur de la perfusion dans le myocarde est représentée par une carte topographique, où l'activité du myocarde est exprimée sur une surface plane, de la même façon que pour une représentation Bullseye. Sur cette carte, chaque pixel peut avoir un maximum de 8 voisins: au-dessus, en dessous, à gauche, à droite, en haut à gauche, en haut à droite, en bas à gauche, et en bas à droite. Cette représentation de la perfusion myocardique est utilisée pour la détermination de l'hétérogénéité de la perfusion par la quantification de l'index H. Au préalable, plusieurs étapes sont nécessaires avant de pouvoir appliquer la méthode d'analyse markovienne sur cette représentation de la perfusion (Johnson 2005). Ainsi, l'activité de l'image est normalisée à la valeur moyenne des 2% de pixels présentant l'activité maximale. Ensuite, l'intensité de la matrice de l'image est normalisée à 1000. Quatre coupes basales et deux coupes apicales sont supprimées pour minimiser les effets de volume partiel, et la variabilité localisée dans la pointe de l'apex. Les pixels avec des valeurs d'intensité en dessous de 500 sont normalisés à 500, et les pixels avec des valeurs d'intensité au-dessus de 850 sont normalisés à 850 pour éliminer les effets des faibles niveaux d'activité cicatricielle, et des hauts niveaux d'activité du myocarde normal. Ces limites confinent l'analyse de l'homogénéité à des valeurs d'activité relative allant de 50% à 85% du maximum de chaque image SPECT, ayant ainsi des valeurs d'intensité allant de 500 à 850, avec une gamme de 35 niveaux de contraste de sorte que chaque niveau d'intensité représente 1% de la plage. C'est pourquoi l'index d'hétérogénéité n'est pas fortement influencé par des défauts de perfusion sévères. La taille des pixels radiaux, et par conséquent la taille du cœur, n'ont pas d'incidence pour le calcul de l'index d'hétérogénéité. Le calcul de l'index peut alors se faire selon la formule vue précédemment :

$$HI = Pd(0) + \frac{1}{4} Pd(1) + \frac{1}{9} Pd(2) + \frac{1}{16} Pd(3) + \dots$$

Par conséquent, l'index d'hétérogénéité HI exprime par une valeur unique la probabilité des différences entre deux pixels voisins, pondérée pour les petites différences d'intensité, et avec peu d'influence sur l'index pour de grandes différences d'intensité, pour diminuer l'influence de graves défauts de perfusion.

#### ***1.1.2.4 Analyses statistiques***

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Un test t de Student est utilisé lors des comparaisons de deux groupes de valeurs non appariées. Une analyse de variance (ANOVA) permet de comparer les interactions entre les différentes méthodes de traitement d'image utilisées et les groupes de patients. Des courbes Receiver Operating Characteristics (ROC) sont utilisées pour évaluer la performance des différentes méthodes de traitement des images pour discriminer deux groupes de patients, où une aire sous la courbe de 1 indique une discrimination parfaite, alors qu'une aire sous la courbe de 0.5 indique que la méthode ne discrimine pas mieux que la chance. Pour toutes les analyses, une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

### **1.1.3 Résultats**

#### ***1.1.3.1 Facteurs de risque***

Les caractéristiques de base de la population diabétique et des patients normaux respectifs sont résumées dans la Table 1.

Il est à noter que les patients du groupe diabétique à haut risque ont 10,4 ans de plus que les patients témoins correspondants, et significativement plus de facteurs de risque cardiovasculaire, en accord avec le protocole de sélection.

	<b>Patients Diabétiques</b>	<b>Patients Normaux</b>
<b>N</b>	39	21
<b>Age - ans</b>	64,5±1,9	54,1±3,3 *
<b>Sexe masculin - n (%)</b>	20 (51)	10 (48)
<b>Surpoids - n (%)</b>	12 (31)	2 (10)
<b>Nombre moyen de facteurs de risque</b>	3,4±0,2	0,4±0,1 **
<b>Antécédants familiaux de cardiopathie - n (%)</b>	2 (5)	1 (5)
<b>Fumeurs actifs - n (%)</b>	6 (15)	0 (0)
<b>Dyslipidémie - n (%)</b>	31 (79)	2 (10)
<b>Hypertension - n (%)</b>	30 (77)	3 (14)
<b>Diabète - n (%)</b>	39 (100)	0 (0)
<b>Pathologie microvasculaire - n (%)</b>	12 (31)	0 (0)

Table 1 : Caractéristiques de base des patients diabétiques et de leurs contrôles respectifs.

\* P < 0.05 vs patients diabétiques ; \*\* P < 0.001 vs patients diabétiques.

### ***1.1.3.2 Index d'hétérogénéité***

Un test ANOVA pour l'ensemble de cette population indique qu'il y a un effet significatif du filtre sur la valeur de l'index H ( $p < 0.0001$ ), et qu'il y a aussi une variation significative des index H entre les groupes diabétiques et normaux ( $p = 0.0067$ ).

En effet, on observe une variation des valeurs moyennes des index H en fonction du filtre, avec des valeurs d'index H qui diminuent lorsque le filtrage est moins important. Les images moins filtrées ont donc un aspect plus hétérogène, ce qui se reflète par un index H plus proche de 0.

Un test t de Student indique que la moyenne des index du groupe diabétique est significativement différente de celle du groupe normal lorsque les images ont des valeurs de filtre de : 0.2/10 au repos et à l'effort ( $p = 0.016$  et  $p = 0.0001$  respectivement), 0.2/20 au repos et à l'effort ( $p = 0.003$  et  $p < 0.0001$  respectivement), et enfin 0.3/10, 0.3/20 et 0.4/10 à l'effort uniquement ( $p = 0.0014$ ,  $p = 0.0004$  et  $p = 0.0235$  respectivement) (Table 2). Si on met en



évidence les filtres qui séparent les deux groupes de façon plus importante, c'est-à-dire si on ne garde que les trois filtres pour lesquels l'écart moyen entre les valeurs du groupe diabétique et celles du groupe normal est le plus important, on obtient alors dans l'ordre d'importance les filtres de valeur : 0.2/10 à l'effort, 0.2/20 à l'effort et 0.3/20 à l'effort.

<b>Test / Filtre</b>	<b>Index Diabétiques</b>	<b>Index Normaux</b>	<b>Ecart moyen - Diabétiques vs Normaux</b>	<b>Rang de l'écart moyen</b>	<b>p</b>
<b>Repos 0.2_10</b>	0.717 ± 0.132	0.798 ± 0.096	0,081	6	0.016
<b>Effort 0.2_10</b>	0.65 ± 0.128	0.801 ± 0.081	0,151	1	0.0001
<b>Repos 0.2_20</b>	0.723 ± 0.121	0.814 ± 0.08	0,091	5	0.003
<b>Effort 0.2_20</b>	0.671 ± 0.114	0.794 ± 0.081	0,123	2	<0.0001
<b>Repos 0.3_10</b>	0.549 ± 0.116	0.602 ± 0.132	0,053	9	0.1156
<b>Effort 0.3_10</b>	0.527 ± 0.109	0.623 ± 0.096	0,096	4	0.0014
<b>Repos 0.3_20</b>	0.571 ± 0.114	0.619 ± 0.126	0,048	10	0.1456
<b>Effort 0.3_20</b>	0.53 ± 0.105	0.637 ± 0.099	0,107	3	0.0004
<b>Repos 0.4_10</b>	0.426 ± 0.095	0.462 ± 0.132	0,036	11	0.2264
<b>Effort 0.4_10</b>	0.421 ± 0.097	0.486 ± 0.115	0,065	7	0.0235
<b>Repos 0.4_20</b>	0.458 ± 0.103	0.482 ± 0.129	0,024	13	0.4508
<b>Effort 0.4_20</b>	0.443 ± 0.095	0.497 ± 0.109	0,054	8	0.0541
<b>Repos 0.5_10</b>	0.35 ± 0.085	0.363 ± 0.118	0,013	16	0.6077
<b>Effort 0.5_10</b>	0.356 ± 0.096	0.372 ± 0.113	0,016	14	0.5815
<b>Repos 0.5_20</b>	0.365 ± 0.081	0.38 ± 0.119	0,015	15	0.5878
<b>Effort 0.5_20</b>	0.368 ± 0.096	0.402 ± 0.105	0,034	12	0.2092
<b>Repos 0.6_10</b>	0.297 ± 0.084	0.303 ± 0.088	0,006	17	0.8022
<b>Effort 0.6_10</b>	0.309 ± 0.09	0.293 ± 0.101	-0,016	19	0.5286
<b>Repos 0.6_20</b>	0.308 ± 0.085	0.309 ± 0.087	0,001	18	0.9603
<b>Effort 0.6_20</b>	0.325 ± 0.097	0.308 ± 0.101	-0,017	20	0.5214

Table 2 : Comparaison des moyennes des index H par un test t de student, entre les groupes diabétiques et normaux.

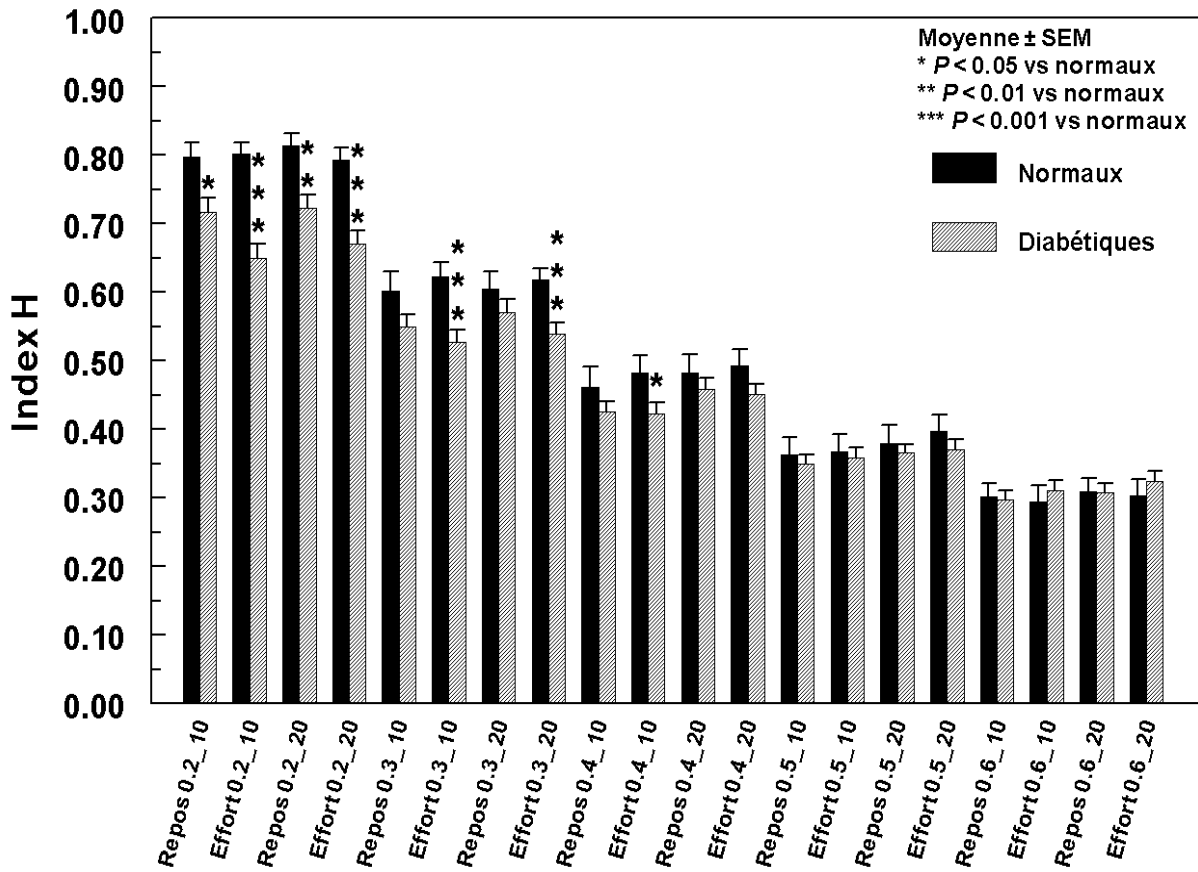


Figure 15 : Répartition des moyennes des index H en fonction des paramètres de filtrage et des groupes.

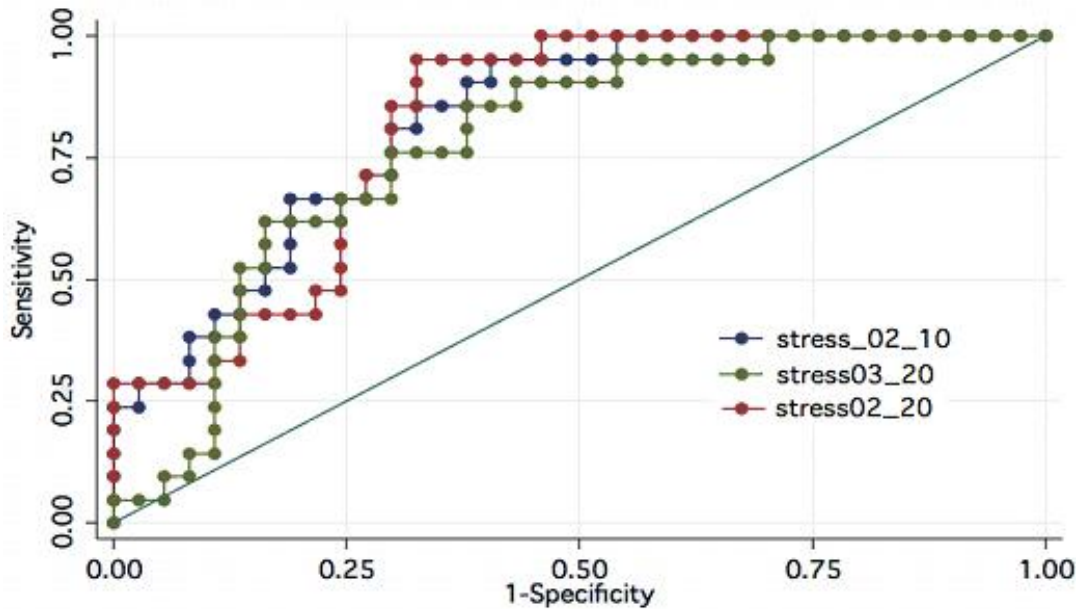


Figure 16 : Courbes ROC pour les trois paramètres de filtre les plus performants.

<b>Test/Filtre</b>	<b>Aire sous la courbe ROC</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Effort 0.2_10</b>	0.8333 ± 0.0522	[0.73106 - 0.93561]
<b>Effort 0.2_20</b>	0.8214 ± 0.0548	[0.71406 - 0.92880]
<b>Effort 0.3_20</b>	0.7712 ± 0.0630	[0.64763 - 0.89470]
<b>Effort 0.3_10</b>	0.7553 ± 0.0637	[0.63035 - 0.88023]
<b>Repos 0.2_20</b>	0.7209 ± 0.0698	[0.58400 - 0.85780]
<b>Effort 0.4_10</b>	0.6997 ± 0.0699	[0.56276 - 0.83671]
<b>Repos 0.2_10</b>	0.6746 ± 0.0726	[0.53228 - 0.81693]
<b>Effort 0.4_20</b>	0.6481 ± 0.0738	[0.50355 - 0.79275]
<b>Repos 0.3_10</b>	0.6190 ± 0.0766	[0.46884 - 0.76925]
<b>Repos 0.3_20</b>	0.6190 ± 0.0769	[0.46838 - 0.76971]
<b>Effort 0.5_20</b>	0.6190 ± 0.0764	[0.46934 - 0.76876]
<b>Repos 0.4_10</b>	0.5728 ± 0.0818	[0.41249 - 0.73301]
<b>Effort 0.5_10</b>	0.5635 ± 0.0778	[0.41104 - 0.71594]
<b>Repos 0.4_20</b>	0.5423 ± 0.0807	[0.38410 - 0.70056]
<b>Repos 0.6_10</b>	0.5212 ± 0.0790	[0.36639 - 0.67594]
<b>Repos 0.5_10</b>	0.4907 ± 0.0839	[0.32636 - 0.65512]
<b>Repos 0.5_20</b>	0.4868 ± 0.0871	[0.31606 - 0.65748]
<b>Repos 0.6_20</b>	0.4683 ± 0.0817	[0.30808 - 0.62843]
<b>Effort 0.6_20</b>	0.4563 ± 0.0790	[0.30160 - 0.61110]
<b>Effort 0.6_10</b>	0.4339 ± 0.0796	[0.27783 - 0.58989]

Table 3 : Récapitulatif des résultats des analyses ROC pour l'ensemble des conditions de filtrage.

Une analyse Receiver Operating Characteristics confirme ces résultats en montrant que les filtres ayant l'aire sous la courbe la plus importante sont les filtres de valeur 0.2/10 à l'effort, 0.2/20 à l'effort et 0.3/20 à l'effort (0.8333±0.0522, 0.8214±0.0548, 0.7712±0.0630 respectivement). Cela indique donc que ce sont les filtres les plus performants pour séparer les

valeurs d'index H du groupe diabétique par rapport à celles du groupe normal. De plus, il n'y a pas de différence significative entre la performance de ces trois filtres (Figure 16 et Table 3).

### **1.1.4 Discussion**

Notre étude a montré que l'imagerie SPECT de la perfusion myocardique au  $^{201}\text{Thallium}$  permet de mettre en évidence, d'analyser et de quantifier en routine l'hétérogénéité de perfusion chez l'homme. Nos résultats confirment le concept d'hétérogénéité du myocarde, mais soulignent également le fait que cet index est grandement influencé par le traitement d'image, en particulier les paramètres de filtre appliqués à la reconstruction de l'image. Les changements dans les valeurs de cut off de 0,2 à 0,6 et de roll off de 10 à 20 ont entraîné des différences importantes dans la perception de l'hétérogénéité et sa quantification. Cela souligne la nécessité d'une uniformisation de ces paramètres entre les laboratoires d'imagerie nucléaire, en particulier au sein d'un même laboratoire pour permettre un suivi longitudinal des patients.

Le filtre Butterworth 0.3/20 est retenu comme le filtre le plus pertinent pour des études ultérieures. En effet, l'analyse de l'index H suite à l'utilisation de ce filtre permet de différencier un groupe de patients diabétiques par rapport à des patients normaux, et il fait partie des filtres les plus performants pour cet usage parmi ceux testés dans cette étude. Par ailleurs, c'est aussi celui qui a été empiriquement retenu depuis plusieurs années au service de médecine nucléaire comme étant le plus pertinent pour les analyses de routine de la perfusion du myocarde, permettant d'établir de bons diagnostics et pronostics. De plus, son utilisation pourrait permettre une analyse simultanée de la perfusion et de l'hétérogénéité en routine clinique. Les filtres 0.2/10 et 0.2/20 ne seront pas retenus : l'analyse ROC a montré que la performance du filtre 0.3/20 n'est pas significativement différente de celle des filtres 0.2/10 et 0.2/20, mais dans le cas de ces deux dernières conditions le filtrage des images semble visuellement si important que la validité de ces images pour une analyse de la perfusion de la microcirculation est fortement remise en cause.

### **1.1.5 Conclusion sur l'étude clinique de l'influence du filtre sur l'analyse markovienne de la perfusion du myocarde en imagerie SPECT**

Cette étude clinique démontre la capacité du  $^{201}\text{Tl}$  en imagerie SPECT de routine à quantifier l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde, et insiste sur l'importance du choix du filtre lors de la reconstruction des images. Le filtre Butterworth 0.3/20 utilisé en routine clinique semble le plus pertinent pour la mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde, et sera donc l'unique filtre utilisé pour les études cliniques suivantes.

## ***1.2 Etude clinique rétrospective***

### **1.2.1 Introduction**

Nous venons de démontrer que l'analyse de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde est applicable à l'imagerie SPECT. Cependant, que ce soit en imagerie PET ou SPECT, aucune donnée n'est disponible sur l'impact pronostique de l'index H sur une population de patients. La seconde étude de ce travail propose donc d'appliquer les résultats précédents, pour quantifier l'hétérogénéité de perfusion du myocarde en imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  chez des patients diabétiques issus d'une étude rétrospective avec un suivi complet, par rapport à des sujets avec un faible niveau de facteurs de risque cardio-vasculaire et une faible probabilité de maladie coronarienne.

### **1.2.2 Méthode**

#### ***1.2.2.1 Sélection de la population***

Une population composée de patients diabétiques issue d'une étude rétrospective et de patients normaux a été sélectionnée pour quantifier l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde, et comparer les résultats obtenus avec les données rétrospectives. Le groupe diabétique se compose de 48 patients à haut risque choisis à partir du registre ARCADIA. Ce registre inclut, sur une période de 3 ans, 245 patients à haut risque avec un diabète de type 1 ou 2, de l'hôpital de Grenoble (Vanzetto 2007). A la différence de la première population, ces patients ARCADIA possèdent donc un suivi renseigné sur plusieurs années. Le groupe contrôle inclus 19 patients du département de cardiologie nucléaire de l'hôpital universitaire de Grenoble.

Les individus normaux présentent des douleurs thoraciques atypiques, une probabilité d'accident coronarien inférieure à 5% (basée sur l'âge et les facteurs de risque cardiovasculaire classiques, selon les critères Diamond et Forrester), et une perfusion du

myocarde normale à l'issue de l'examen au  $^{201}\text{Tl}$ . Les patients des groupes diabétiques répondent aux critères suivants : âge inférieur à 85 ans, sans antécédent clinique de maladie coronaire, aucun des symptômes typiques d'angine de poitrine, et présentant plus de 3 indicateurs pronostiques cliniques classiques et biologiques sur 13. Tous les patients ont subi une imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  avec une épreuve d'effort ou une injection de dipyridamole.

### ***1.2.2.2 Protocole d'imagerie SPECT***

Les exercices de stress et l'imagerie SPECT ont été réalisés de façon identique selon les protocoles de routine utilisés au service de médecine nucléaire de Grenoble, comme décrit précédemment (Machecourt 1994, Vanzetto 2007). A la fin de l'effort, 2,5 mCi (92,5 MBq) de  $^{201}\text{Thallium}$  sont injectés par voie intraveineuse, et les premières images couplées à l'ECG sont enregistrées 10 minutes plus tard. Trois heures après l'épreuve d'effort, 1 mCi (37,5 MBq) de  $^{201}\text{Thallium}$  est injecté au repos avec une nouvelle acquisition couplée à l'ECG 15 minutes plus tard (imagerie de la reperfusion). Les images ont été acquises en utilisant une gamma-caméra à double tête, en rotation, avec une orbite circulaire à  $180^\circ$  (32 projections).

Pour les images issues de la base de données ARCADIA et celles des témoins sélectionnés, un pré-traitement uniforme a été appliqué pour la reconstruction des données brutes, et les images ont été reconstruites en utilisant un filtre Butterworth, et réorientées pour obtenir des sections transaxiales du ventricule gauche selon les trois plans cardiaques standards (Sopha NXT, Sopha Medical, Paris, France). Nous avons choisi le filtre Butterworth couramment utilisé dans le laboratoire de cardiologie nucléaire, dont les valeurs de cut-off et de roll-off sont de 0.3 et 20 respectivement. Comme nous venons de le voir, ce filtre est celui qui a été empiriquement retenu comme étant le plus pertinent au service de médecine nucléaire pour les analyses de routine de la perfusion du myocarde, et il semble le plus pertinent pour la mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.

### 1.2.2.3 Analyse des images

Toutes les images reconstruites ont été envoyées au Laboratoire du Dr. Nils Johnson (Feinberg School of Medicine, North-Western University, Chicago, Illinois) et une analyse automatisée a été réalisée comme décrit précédemment (Johnson 2005). En conséquence, l'index H a été calculé pour chaque patient et exprimé par un nombre compris entre 0 et 1, avec une hétérogénéité plus importante pour des valeurs d'index H plus proches de 0.

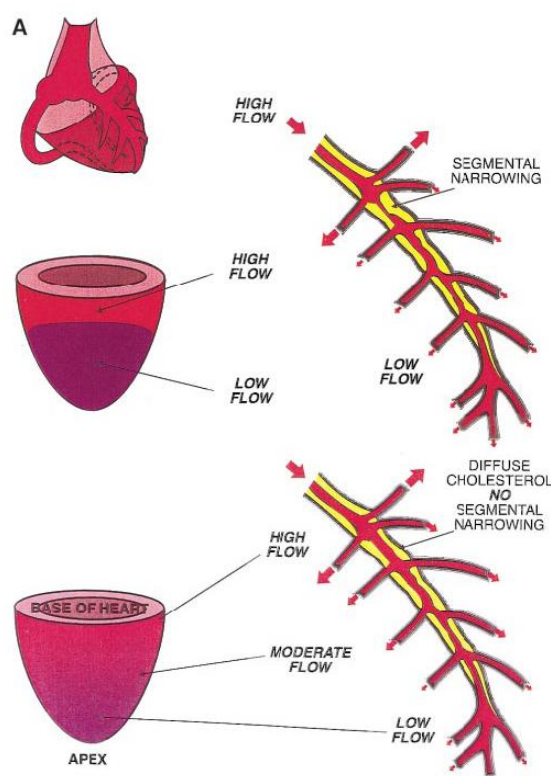


Figure 17 : Représentation de défauts de perfusion du myocarde causés soit par une sténose localisée (schéma du haut), soit par un rétrécissement diffus des artères coronaires (schéma du bas) (Gould 2000).

En plus d'une analyse markovienne de l'hétérogénéité, une mesure du gradient longitudinal de la perfusion du myocarde (LGA) est effectuée pour les données du groupe ARCADIA. Cette méthode a été décrite par Gould et coll. en 2000 (Gould 2000), et utilisée par la suite par Johnson et Gould dans leur étude sur l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde (Johnson 2005). Elle repose sur la mesure de l'activité relative de la base à l'apex, pour chacun des quatre quadrants cardiaques décrits précédemment. Le but est de mettre en évidence des défauts de perfusion diffus. En effet, si on ne prend en compte que l'activité totale de chaque



quadrant, une diminution brutale de l'activité pour l'un des quadrants pourrait refléter un rétrécissement coronaire segmentaire pouvant être causé par une sténose localisée, provoquant donc une diminution brutale de la perfusion en aval. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, il peut se développer de façon précoce des défauts de perfusion diffus causés par des rétrécissements coronaires qui n'induisent pas de sténose et ne sont pas détectables par l'observation de la moyenne de l'activité par quadrant. Par l'utilisation du LGA, ce sont ces défauts diffus le long des coronaires qui sont recherchés (Figure 17). Tout comme la mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde, une méthode pour la mesure de ces défauts légers pourrait permettre une détection précoce du développement de la maladie coronaire.

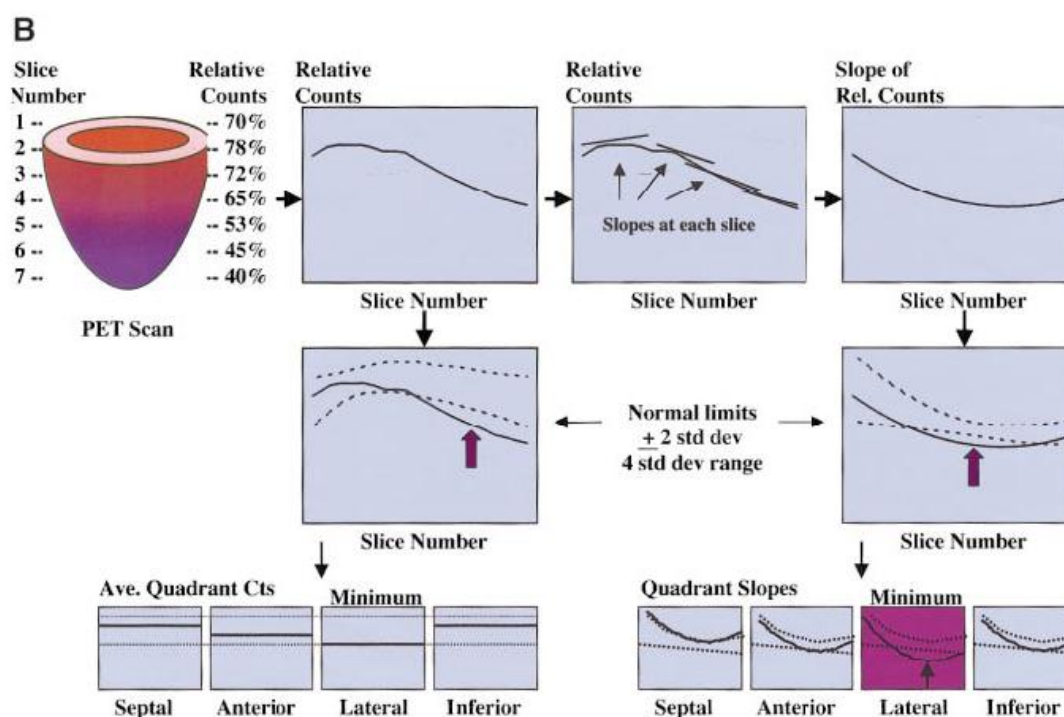


Figure 18 : Protocole de l'analyse du gradient longitudinal. En haut à gauche est représentée la courbe des activités relatives (sur l'axe des ordonnées) de la base à l'apex (de gauche à droite sur l'axe des abscisses) pour un quadrant, et en haut à droite la courbe des valeurs des pentes (sur l'axe des ordonnées) correspondantes, toujours de la base à l'apex (de gauche à droite sur l'axe des abscisses). Les flèches mauves et la flèche dans le quadrant mauve représentent l'exemple d'un défaut de perfusion diffus, qui provoque une diminution longitudinale de la perfusion. Ce défaut se traduit par une valeur de pente des activités relatives plus basse dans l'un des quatre quadrants (en bas à droite), mais pas par une diminution significative de la moyenne de l'activité du quadrant correspondant (en bas à gauche) (Gould 2000).

Pour chaque quadrant cardiaque, l'activité au niveau de chaque coupe petit axe de la base à l'apex est mesurée, puis une courbe d'activités relatives de la base à l'apex est représentée. Quatre courbes d'activités relatives sont donc tracées pour chaque image de la perfusion cardiaque, c'est-à-dire une par quadrant. A partir de chacune de ces courbes, des courbes de la pente des activités relatives de la base à l'apex sont tracées. Chaque valeur de cette seconde courbe représente les pentes en chaque point de la courbe précédente des activités relatives. Des valeurs positives indiquent une augmentation de la perfusion de la base à l'apex, et les valeurs négatives indiquent une diminution de la perfusion. Plus la valeur négative sera basse, plus elle indiquera une diminution rapide de la perfusion et pourrait donc refléter la présence d'un défaut diffus. A nouveau, quatre courbes des pentes des activités relatives longitudinales sont obtenues pour chaque acquisition, c'est-à-dire une par quadrant (Figure 18).

Une seule valeur par acquisition sera conservée : la valeur minimale parmi les quatre courbes des pentes des activités relatives, c'est-à-dire la valeur négative maximale, qui représente la diminution de la perfusion la plus importante par image de la perfusion du myocarde. Cette valeur unique permet donc de quantifier les effets de dynamique des fluides d'un rétrécissement coronaire diffus dans la distribution d'une artère coronaire chez un patient. Pour cette étude, cette valeur a donc été mesurée pour chaque patient du groupe ARCADIA et des patients normaux respectifs, au repos et à l'effort.

### ***1.2.2.4 Analyses statistiques***

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Un test t de Student est utilisé lors des comparaisons de deux groupes de valeurs non appariées. Pour toutes les analyses, une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

## 1.2.3 Résultats

### 1.2.3.1 Facteurs de risque

Les caractéristiques de base de la population ARCADIA et des patients normaux respectifs sont résumées dans la Table 4.

	<b>Patients Diabétiques</b>	<b>Patients Normaux</b>
<b>N</b>	46	19
<b>Age - ans</b>	59.9±8.7	53.4±3.4 *
<b>Sexe masculin - n (%)</b>	31 (67)	12 (63)
<b>Poids - Kg</b>	80.5±17.9	ND
<b>Taille - Mètres</b>	1.67±0.08	ND
<b>BMI - Kg/m<sup>2</sup></b>	28.8±6.0	ND
<b>Nombre moyen de facteurs de risque</b>	2.7±0.8	0
<b>Antécédants familiaux de cardiopathie - n (%)</b>	6 (13)	0
<b>Fumeurs actifs - n (%)</b>	14 (30)	0
<b>Dyslipidémie - n (%)</b>	26 (57)	0
<b>Hypertension - n (%)</b>	37 (80)	0
<b>Diabète - n (%)</b>	46 (100)	0
<b>Durée du diabète - ans</b>	13.9±9.8	–
<b>Pathologie microvasculaire – n (%)</b>	27 (59)	–

Table 4 : Caractéristiques de base des patients ARCADIA et de leurs contrôles respectifs.

ND : données non disponibles. \* P<0.05 vs patients diabétiques.

Il est à noter que les patients diabétiques à haut risque du groupe ARCADIA ont 6,5 ans de plus que les patients témoins correspondants, et significativement plus de facteurs de risque cardiovasculaire, en accord avec le protocole de sélection.

### 1.2.3.2 Index d'hétérogénéité

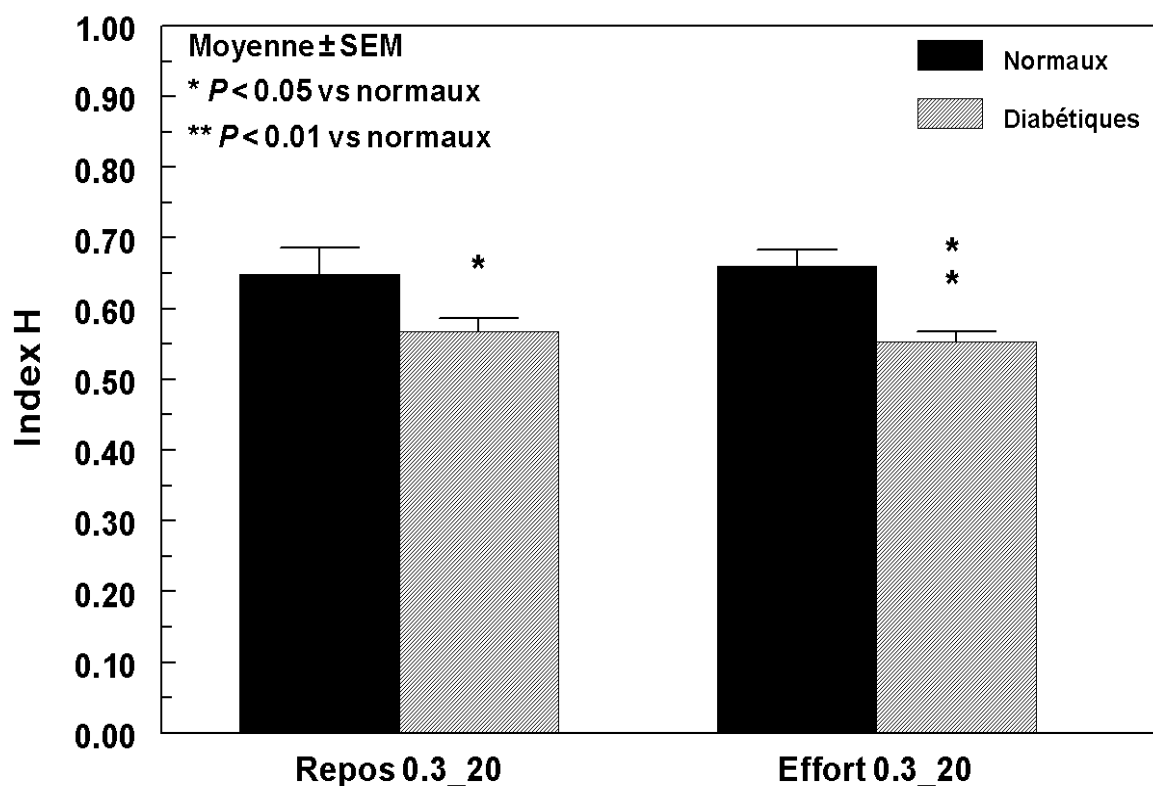


Figure 19 : Comparaison entre les moyennes d'index H obtenues avec les filtres Butterworth 0.3/20, chez le diabétique et le contrôle des groupes, pour les images de repos et d'effort.

Les index H sont significativement plus faibles chez les patients diabétiques que pour les sujets normaux, en utilisant le filtre Butterworth 0.3/20, à la fois sur les images de repos ( $0.57 \pm 0.02$  vs  $0.65 \pm 0.04$ , respectivement,  $p < 0,03$ ) et d'effort ( $0.55 \pm 0.01$  vs  $0.66 \pm 0.02$ , respectivement,  $p < 0,003$ ). Une plus grande différence entre les index H des patients diabétiques et normaux a été obtenue en utilisant des images d'effort reconstruites avec le filtre Butterworth 0.3/20 ( $p < 0,01$  par rapport aux autres données).

Pour chaque groupe, aucune différence significative n'a été observée entre les moyennes des index H au repos par rapport à l'effort.

Nous avons évalué la corrélation potentielle entre les index H obtenus avec le filtre Butterworth 0.3/20 appliqué sur des images de perfusion cardiaque d'effort (le protocole

d'imagerie le plus efficace) et les paramètres cliniques et biologiques qui pourraient être responsables de l'hétérogénéité de perfusion myocardique. Comme le montre la Table 5, aucun des paramètres testés ne montre de corrélation significative avec l'index H.

<b>Variable</b>	<b>R</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Age</b>	0.06	0.004	NS
<b>Durée de la thérapie à l'insuline</b>	0.14	0.02	NS
<b>BMI</b>	0.082	0.059	0.063
<b>Poids</b>	0.024	0.001	NS
<b>Taux de filtration glomérulaire</b>	0.062	0.004	NS
<b>Créatinine</b>	0.147	0.022	NS
<b>Durée du diabète</b>	0.017	< 0.001	NS
<b>Indice de Sokolov en ECG</b>	0.132	0.017	NS
<b>Pression sanguine diastolique</b>	0.104	0.011	NS
<b>Pression sanguine systolique</b>	0.066	0.004	NS
<b>Nb de facteurs de risque cardiovasculaires</b>	0.034	0.001	NS
<b>Glucose sanguin</b>	0.119	0.014	NS
<b>HbA1c</b>	0.033	0.01	NS
<b>Cholestérol HDL</b>	0.1	0.01	NS
<b>Cholestérol LDL</b>	0.15	0.023	NS
<b>Protéinurie</b>	0.039	0.004	NS
<b>Microalbuminurie</b>	0.147	0.022	NS

Table 5 : Corrélation entre les index H et les facteurs de risque des patients de la cohorte ARCADIA.

Le groupe diabétique se compose de patients à haut risque choisis à partir du registre ARCADIA, qui possèdent un suivi renseigné sur plusieurs années suite à l'imagerie SPECT

de la perfusion du myocarde. Lors de ce suivi, quatre patients parmi les patients sélectionnés pour cette étude avaient été victimes d'un évènement cardiovasculaire. Or, comme le montre la Figure 20, les index H de ces quatre patients se retrouvent parmi les index les plus faibles de tous les patients diabétiques, ce qui est particulièrement remarquable sur les images d'effort. Ces résultats indiquent que les images de la perfusion du myocarde de ces quatre patients ont été analysées comme faisant parties des images les plus hétérogènes.

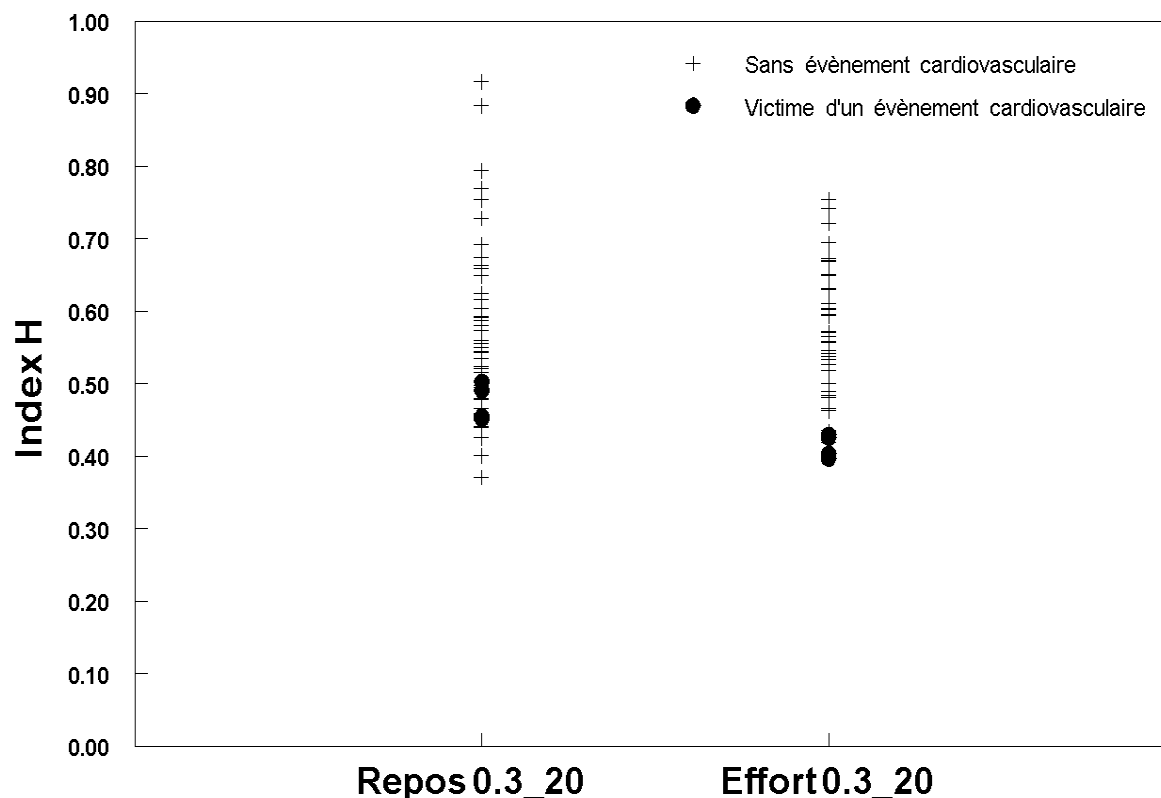


Figure 20 : Répartition des patients du groupe ARCADIA au repos et à l'effort selon l'index H correspondant. Les patients ayant été victime d'un accident cardiovasculaire durant le suivi de l'étude ARCADIA sont mis en évidence par un point noir.

### 1.2.3.3 Gradient longitudinal de perfusion

Les résultats obtenus dans l'étude du gradient longitudinal de la perfusion sont présentés dans la Figure 21. La valeur de la pente la plus petite a été mesurée pour chaque image de la

perfusion cardiaque. La moyenne de ces valeurs a été calculée pour chaque groupe, au repos et à l'effort.

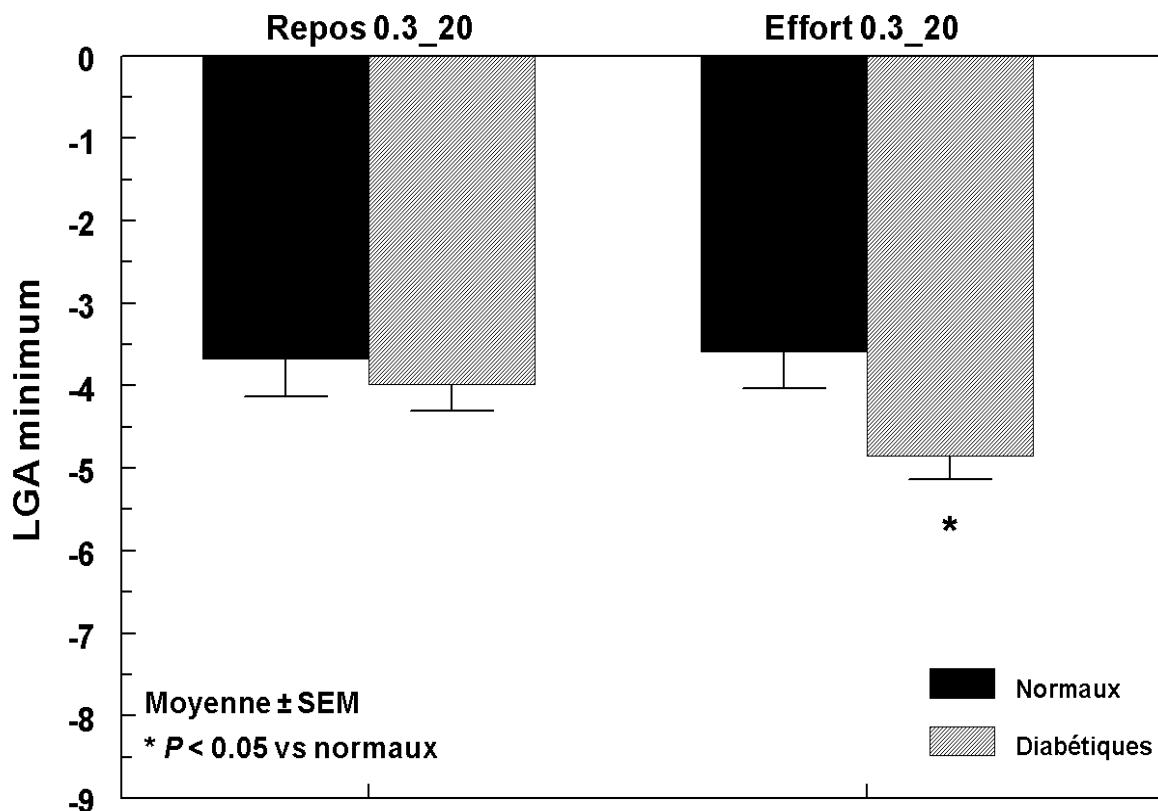


Figure 21 : Comparaison entre les moyennes des valeurs des pentes les plus petites des gradients longitudinaux de perfusion.

Malgré une tendance des valeurs des patients diabétiques à être plus basses, il n'a été observé aucune différence significative entre les moyennes au repos des patients normaux et des patients diabétiques ( $-3.7 \pm 0.4$  vs  $-4.0 \pm 0.3$ , respectivement,  $P=NS$ ). Par contre, il a été noté une différence significative entre les index des groupes de patients normaux et diabétiques à l'effort ( $-3.6 \pm 0.4$  vs  $-4.8 \pm 0.3$ , respectivement,  $P < 0.05$ ). Alors que les moyennes pour les patients normaux restent stables entre le repos et l'effort, les moyennes pour les patients diabétiques diminuent à l'effort par rapport au repos. Statistiquement, pour le groupe diabétique filtré à 0.3/20 les valeurs des pentes minimales sont significativement plus négatives à l'effort par rapport au repos ( $P < 0.05$ ).

## 1.2.4 Discussion

Les états pré-diabétiques de l'insulino-résistance, y compris l'altération de la tolérance au glucose et le syndrome métabolique (Schelbert 2009), sont associés à un ensemble de facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, en augmentant les risques d'accidents coronariens des patients. La fonction endothéliale est considérée comme un biomarqueur de la maladie vasculaire et représente le lien entre des phénomènes complexes au niveau moléculaire et dans la pathologie vasculaire de l'athérosclérose.

Gould et Johnson ont mis en évidence un nouveau concept dans l'imagerie de la perfusion en PET en démontrant une relation étroite entre l'hétérogénéité de la perfusion au repos et la maladie coronarienne à un stade précoce ou avancé (Johnson 2005). La dysfonction endothéliale des artères coronaires se réfère à un large éventail de physiopathologies vasomotrices des vaisseaux coronaires associées à des accidents vasculaires pouvant impliquer les artères coronaires épigardiques ou microvasculaires, différents médiateurs vasoactifs, différents stimuli, et différentes manifestations physiopathologiques ou cliniques. Les stimuli, les médiateurs, et les réponses vasculaires des artères coronaires épigardiques et microvasculaires sont très différents, voire divergents. Ainsi, il n'y a pas d'anomalie vasomotrice spécifique unique, de gold-standard, de test diagnostique, ou même de définition qui identifie ou définit la dysfonction endothéliale coronaire. Les données de Gould et Johnson indiquent que l'hétérogénéité de perfusion myocardique de repos est une manifestation de ce large spectre de comportements vasculaires coronaires qui est un puissant facteur prédictif d'accidents vasculaires, en plus des facteurs de risque standard.

En France, l'imagerie SPECT est la technique de routine pour évaluer la perfusion du myocarde et les caméras SPECT sont largement répandues, tandis que la PET est principalement réservée à des fins de recherche.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment qu'un filtre Butterworth 0.3/20 appliqué sur des images de perfusion cardiaque d'effort possède la capacité en routine clinique de séparer des patients ayant un haut risque cardiovasculaire par rapport à ceux ayant un faible risque, en fonction de l'index H. En effet, nous avons trouvé une différence significative en termes d'index d'hétérogénéité de la perfusion du myocarde entre des sujets à haut risque et à faible risque.



La première étude portant sur l'analyse markovienne pour la quantification de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde en imagerie PET avait révélé des index H de 0.63 en moyenne chez un groupe de patients sains au repos (Johnson 2005). Les résultats que nous avons obtenus sur des groupes de patients normaux avec des images traitées filtrées à 0.3/20 sont particulièrement proches des résultats publiés par Johnson et Gould. En effet, les patients normaux de la population pour l'évaluation du filtre avaient une moyenne des index H de 0.62 au repos. De façon similaire, pour les patients normaux comparés à la population ARCADIA, les moyennes étaient de 0.65 au repos. Contrairement à notre groupe de patients uniquement diabétiques, la population de l'étude initiale de Johnson regroupait des patients souffrant de diverses pathologies, et avait été séparée en différents groupes suivant les valeurs de leurs index H. Cependant, nous avons choisi pour cette étude de ne pas séparer les patients diabétiques en différentes catégories suivant leur index H, et malgré cela, nous conservons des différences significatives entre les moyennes des patients normaux et diabétiques. En outre, il est à noter que nos résultats chez les patients diabétiques tendent vers une dégradation des valeurs de l'index à l'effort par rapport au repos, contrairement à ce que Gould et Johnson avaient remarqué dans leur étude en imagerie PET où les index avaient tendance à se normaliser à l'effort. Nos résultats sont pourtant en adéquation avec le principe de l'imagerie cardiaque à l'effort, qui est depuis longtemps validé en routine clinique pour démasquer des défauts de perfusion invisibles en imagerie cardiaque de repos. Les valeurs d'index diminuant à l'effort seraient donc le reflet de ces défauts de perfusion qui sont démasqués, augmentant ainsi l'hétérogénéité de l'image.

Cette supposition pourrait être confirmée par les valeurs obtenues lors de l'analyse du gradient longitudinal de la perfusion. En effet, les valeurs des pentes les plus petites des patients diabétiques à l'effort sont significativement plus basses que celles des patients normaux. Lors de la première étude sur ce sujet, Gould et coll. avaient noté que la pente minimale chez un groupe de patients sains à l'effort était en moyenne de -2.5. Cette valeur a été comparée aux moyennes des pentes minimales obtenues dans plusieurs groupes de patients classés en différentes catégories suivant la sévérité de leurs défauts de perfusion à l'effort. Malgré des différences dans la sévérité des défauts de perfusion, et même pour des patients avec de faibles défauts de perfusion, les valeurs des moyennes étaient comprises entre -3.2 et -3.7 et toutes significativement différentes des valeurs obtenues chez les patients normaux. Cet index semblait donc pouvoir mettre en évidence des défauts de perfusions diffus, et ce même en l'absence d'une ischémie (Gould 2000). Les valeurs que nous avons observées pour les patients ARCADIA à l'effort, avec l'utilisation du filtre 0.3/20, étaient en

moyenne de -4.8, et de -3.6 pour les patients normaux. Ces valeurs observées sont plus négatives que celles de la publication de Gould, mais nous conservons une différence significative entre les patients diabétiques et les patients normaux, uniquement à l'effort. Cette observation tend à indiquer des défauts de perfusion diffus chez ces patients diabétiques causant ainsi une diminution graduelle plus importante de la perfusion de la base à l'apex, qui se révélerait à l'effort.

Enfin, nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre l'index H et les facteurs de risque cardiovasculaire individuels ou des marqueurs de maladie microvasculaire, comme la rétinopathie ou une protéinurie. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse que l'hétérogénéité est multifactorielle et probablement une variable diagnostique et pronostique indépendante pour l'évaluation de maladies micro et macrovasculaires chez les patients à haut risque, comme initialement proposé par Johnson et Gould (Johnson 2005). Par contre, Nous avons pu noter que lors du suivi des patients issus du registre ARCADIA, quatre patients furent victimes d'un évènement cardiovasculaire. De façon remarquable, les index H à l'effort de ces quatre patients font parties des index H les plus faibles parmi les autres patients analysés, ce qui indique que les images de la perfusion du myocarde obtenues avant la survenue de leurs évènements cardiovasculaires respectifs ont été analysées et quantifiées comme étant parmi les plus hétérogènes. Ces derniers résultats sont très encourageants pour poursuivre les recherches sur l'impact pronostique de l'index H.

### **1.2.5 Conclusion sur l'étude clinique rétrospective**

Cette seconde étude clinique confirme le concept de l'hétérogénéité du myocarde chez les patients diabétiques à haut risque issus d'une étude rétrospective, et la capacité en routine du <sup>201</sup>Thallium en imagerie SPECT à quantifier cette hétérogénéité. Par la suite, une étude prospective en cours déterminera l'impact potentiel de cette technique sur la gestion et le pronostic de ces patients, et la valeur additive de l'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde sur les tests cliniques préexistants.

## 2 Etude expérimentale

L'adaptation de la mesure de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde aux études expérimentales sur le petit animal pourrait fournir un outil supplémentaire applicable à de nombreuses études physiopathologiques pour évaluer l'état de la fonction endothéliale. L'objet de cette étude est de tester l'hypothèse que l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde pourrait être quantifiée en imagerie du petit animal SPECT, chez des modèles animaux de diabète, et serait en corrélation avec des altérations du myocarde. Cependant, deux études sur la méthodologie ont été préalablement nécessaires. Tout d'abord, le format des images obtenues avec l'une des deux caméras dédiées au petit animal disponibles au laboratoire n'est pas compatible avec le programme originel décrit précédemment. En conséquence, un programme a été développé spécifiquement pour permettre l'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde à partir de ces images. Le format des images cliniques étant compatible avec les deux programmes, une première étude méthodologique a donc eu pour but de comparer des résultats obtenus en analysant une série d'images cliniques avec le programme spécifique par rapport aux résultats obtenus en analysant ces mêmes images avec le programme originel. De plus, pour permettre l'évaluation de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde il devrait être nécessaire d'injecter une activité de radiotraceur minimale aux animaux pour obtenir des statistiques de comptage suffisantes. En effet, on pourrait imaginer que l'injection d'une activité insuffisante du radiotraceur provoquerait une hétérogénéité observée sur les images de perfusion, qui serait moins liée à un phénomène biologique qu'à d'insuffisantes statistiques de comptage. Une seconde étude méthodologique a donc évalué l'évolution des valeurs de l'index H en fonction des activités de différents radiotraceurs.

## ***2.1 Etude méthodologique***

### **2.1.1 Etude comparative de deux méthodes d'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde**

#### ***2.1.1.1 Introduction***

Deux programmes développés différemment, mais basés sur la même méthode d'analyse markovienne, sont utilisés selon le format des images pour quantifier l'hétérogénéité des images expérimentales de la perfusion du myocarde. Le premier est le programme originel qui a été décrit et utilisé précédemment, et le second a été développé spécifiquement pour l'étude expérimentale de ce travail. Cette étude a pour but de comparer des résultats obtenus avec ces deux programmes à partir d'images cliniques, dont le format est compatible avec les deux programmes.

#### ***2.1.1.2 Méthode***

##### **2.1.1.2.1 Population étudiée**

Pour cette étude, une population de 45 patients diabétiques et 15 patients normaux du département de cardiologie nucléaire de l'hôpital universitaire de Grenoble a été sélectionnée afin de comparer deux méthodes d'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde. Tous les patients ont subi une imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  avec une épreuve d'effort ou une injection de dipyridamole. Pour chaque patient, les acquisitions au repos et à l'effort ont chacune été analysées par les deux programmes décrits ci-dessous, permettant chacun une analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.

#### **2.1.1.2.2 Protocole d'imagerie SPECT**

Les exercices de stress et l'imagerie SPECT ont été réalisés de façon identique selon les protocoles de routine utilisés au service de médecine nucléaire de Grenoble, comme décrit précédemment (Machecourt 1994, Vanzetto 2007). A la fin de l'effort, 2,5 mCi (92,5 MBq) de  $^{201}\text{Thallium}$  sont injectés par voie intraveineuse, et les premières images couplées à l'ECG sont enregistrées 10 minutes plus tard. Trois heures après l'épreuve d'effort, 1 mCi (37,5 MBq) de  $^{201}\text{Thallium}$  est injecté au repos avec une nouvelle acquisition couplée à l'ECG 15 minutes plus tard (imagerie de la reperfusion). Les images ont été acquises en utilisant une gamma-caméra à double tête, en rotation, avec une orbite circulaire à  $180^\circ$  (32 projections).

Pour les images des patients diabétiques et celles des témoins sélectionnés pour cette étude, un pré-traitement uniforme a été appliqué pour la reconstruction des données brutes, et les images ont été reconstruites en utilisant un filtre Butterworth, et réorientées pour obtenir des sections transaxiales du ventricule gauche selon les trois plans cardiaques standards (Sopha NXT, Sopha Medical, Paris, France). Nous avons choisi le filtre Butterworth couramment utilisé dans le laboratoire de cardiologie nucléaire, dont les valeurs de cut-off et de roll-off sont de 0.3 et 20 respectivement.

#### **2.1.1.2.3 Analyse des images**

Toutes les images reconstruites ont été envoyées au Laboratoire du Dr. Nils Johnson (Feinberg School of Medicine, North-Western University, Chicago, Illinois) et une analyse automatisée a été réalisée comme décrit précédemment grâce à l'utilisation du programme originel (Johnson 2005).

Cependant, le format des images obtenues avec la gamma-caméra du laboratoire (Gamma-imageur S<sup>®</sup>, Biospace Lab, Paris, France) est spécifique et ne permet pas un transfert vers le programme originel d'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion, développé par les Dr. Nils Johnson et Lance K Gould (Johnson 2005). Un programme spécifique a donc été développé au laboratoire, pour permettre l'analyse de l'index H à partir des données obtenues avec cette caméra.

L'étape de préparation des images tomographiques consiste à obtenir des coupes petit axe du cœur, de la base à l'apex, grâce au logiciel AMIRA (Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin and Indeed - Visual Concepts GmbH, Germany). Les fichiers de ces coupes sont au format propriétaire bvr (Biospace Lab, Paris, France) et ne peuvent être lus que par le logiciel GammaVision+ (Biospace Lab, Paris, France). Le logiciel est utilisé pour convertir les images au format dicom. Ces images nécessitent une conversion supplémentaire au format tiff, qui est le seul format accepté par le programme développé au laboratoire, et cette conversion se fait grâce au logiciel OsiriX (University Hospital of Geneva, Switzerland). Les coupes sont alors prêtes à être importées dans le programme permettant la détermination de l'index H et spécifiquement développé au laboratoire.

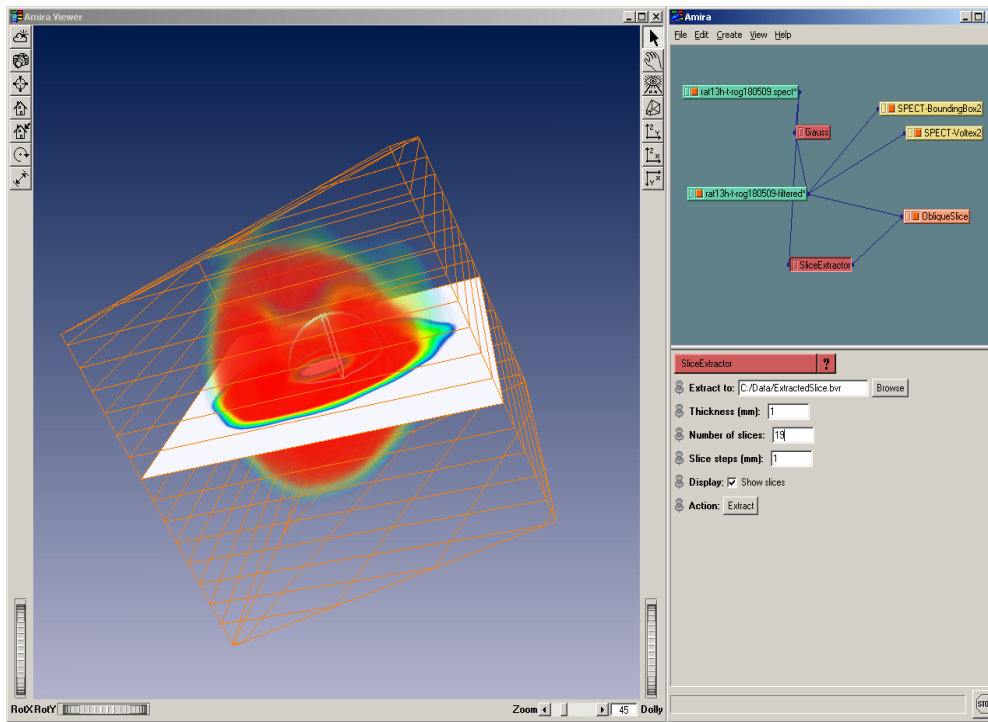


Figure 22 : Exemple d'extraction des coupes petit axe d'une image de perfusion cardiaque expérimentale, avec le logiciel AMIRA.

Ce programme a été développé avec le logiciel PYTHON (Python Software Foundation, United States), et est composé de deux parties distinctes. La première permet de reconstruire une carte topographique du cœur. Ainsi, à partir de chaque coupe petit axe, l'utilisateur détermine manuellement les limites intérieures et extérieures des parois du ventricule gauche afin de ne considérer que l'activité myocardique. Toujours pour chaque coupe, l'utilisateur place ensuite un repère au centre du cercle délimité par la paroi extérieure du VG. Le

programme considère ce centre comme l'origine des 64 rayons qui seront tracés pour chaque coupe. Entre chaque rayon, l'activité de la paroi est sommée et cette valeur sera attribuée au pixel correspondant sur la carte topographique.

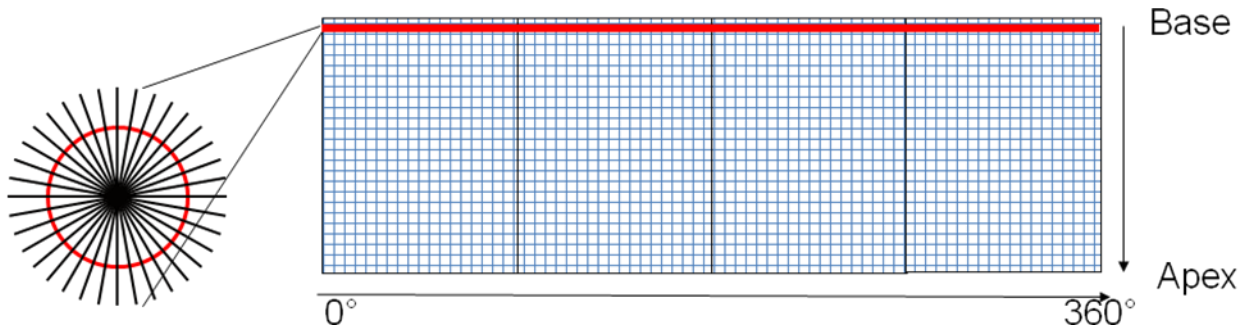


Figure 23 : Représentation schématique du passage d'une coupe petit axe à une ligne de la carte topographique. Entre chaque rayon, l'activité de la paroi est sommée pour ne donner qu'une seule valeur, qui correspondra à un seul pixel de la carte topographique.

On obtient donc une carte topographique composée de X lignes correspondant au même nombre de coupes petit axe (le nombre de coupes varie selon la taille du cœur) le long du grand axe du ventricule gauche, de la base à l'apex. Chaque coupe petit axe correspond à une ligne de la carte topographique. Cette ligne est composée de 64 pixels (ce qui représente un angle de 360° sur la coupe petit axe). Par conséquent, la taille absolue du pixel est de  $N \cdot M$ , où N est de  $1/X$  (différent pour chaque acquisition) et M est de  $360^\circ/64$  (identique pour chaque acquisition).

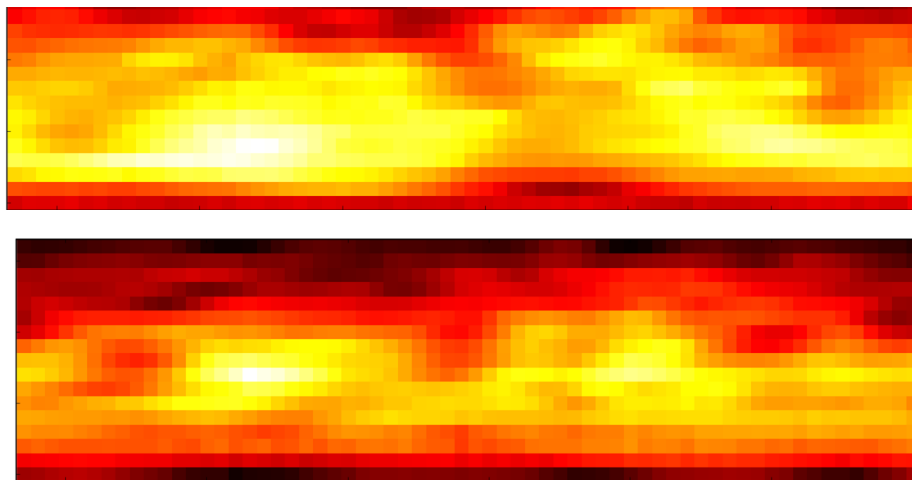


Figure 24 : Exemples de carte topographique obtenue à partir d'images de perfusion cardiaque expérimentales grâce au programme spécifique développé au laboratoire.

La deuxième partie du programme permet d'appliquer la méthode d'analyse markovienne décrite précédemment à la carte topographique et d'obtenir l'index H correspondant à l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.

En conséquence, l'index H a été calculé pour chaque patient et par chaque programme, et exprimé par un nombre compris entre 0 et 1, avec une hétérogénéité plus importante pour des valeurs d'index H plus proches de 0.

#### **2.1.1.2.4 Analyses statistiques**

Pour comparer les deux méthodes d'analyse markovienne, un test de Passing & Bablok est utilisé pour comparer les valeurs d'index H obtenues avec les deux programmes. Les tests sont réalisés avec le logiciel MedCalc (MedCalc Software, Belgium). Une régression linéaire de Passing & Bablok est appliquée sur la distribution graphique comparant les deux mesures, et fournit une équation de la forme  $Y = A + BX$ , où A est la valeur pour laquelle la droite coupe l'axe des ordonnées et B est la pente de la droite. La pente de la droite de Passing & Bablok indique l'estimation de l'erreur systématique proportionnelle et l'ordonnée à l'origine l'erreur systématique constante. Cette analyse teste l'hypothèse que  $A=0$  et  $B=1$ . Si les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes, l'intervalle de confiance de la pente doit inclure la valeur 1, et l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine doit inclure la valeur 0. En effet, si on accepte que  $A=0$  et  $B=1$ , on peut supposer que  $Y'=X'$ , et donc que les méthodes sont identiques. Un test de CUSUM (sommation cumulative) permet de tester la significativité de la relation linéaire entre les deux méthodes, où  $P<0.05$  indique une différence significative entre les deux techniques.



### 2.1.1.3 Résultats

Les paramètres de base des index H obtenus sont présentés dans la Table 6. On peut noter que les moyennes des index H obtenues pour les patients diabétiques sont très proches entre les deux méthodes. Cependant, pour les index H obtenus chez les patients normaux, les valeurs semblent plus élevées lorsque les images sont traitées avec le programme originel, avec une différence significative par rapport au programme spécifique pour les valeurs des patients normaux au repos ( $P < 0.05$ ).

	Normaux, Repos		Normaux, Effort		Diabétiques, Repos		Diabétiques, Effort	
	Variable X	Variable Y	Variable X	Variable Y	Variable X	Variable Y	Variable X	Variable Y
<b>Plus petite valeur</b>	0.4643	0.334	0.3905	0.307	0.2365	0.249	0.2536	0.233
<b>Plus grande valeur</b>	0.9224	0.762	0.6595	0.592	0.7744	0.688	0.5646	0.519
<b>Moyenne arithmétique</b>	0.6633	0.5144	0.4822	0.4379	0.3866	0.3878	0.3629	0.3721
<b>Médiane</b>	0.6306	0.534	0.4872	0.437	0.3504	0.386	0.3508	0.371
<b>SD</b>	0.1624	0.1315	0.0664	0.06937	0.1197	0.07873	0.07007	0.0614
<b>SEM</b>	0.04193	0.03394	0.01715	0.01791	0.01784	0.01174	0.01044	0.009152

Table 6 : Paramètres des index H obtenus par les deux méthodes d'analyse markovienne.

Variable X : valeurs obtenues avec le programme originel. Variable Y : valeurs obtenues avec le programme spécifique.

Les droites de régression obtenues avec le test de Passing & Bablok sont représentées sur la Figure 25, et les équations correspondantes dans la Table 7. Malgré le cas de la population diabétique au repos où il ne semble pas y avoir de corrélation entre les deux méthodes d'analyse, dans tous les autres cas l'intervalle de confiance de la pente inclut la valeur 1, et l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine inclut la valeur 0. Ceci indique une bonne corrélation entre les deux programmes dans l'analyse des images des patients normaux et des patients diabétiques à l'effort. De plus, pour tous les cas nous n'observons pas de déviation significative par rapport au modèle de régression linéaire ( $P > 0.10$  dans tous les cas).

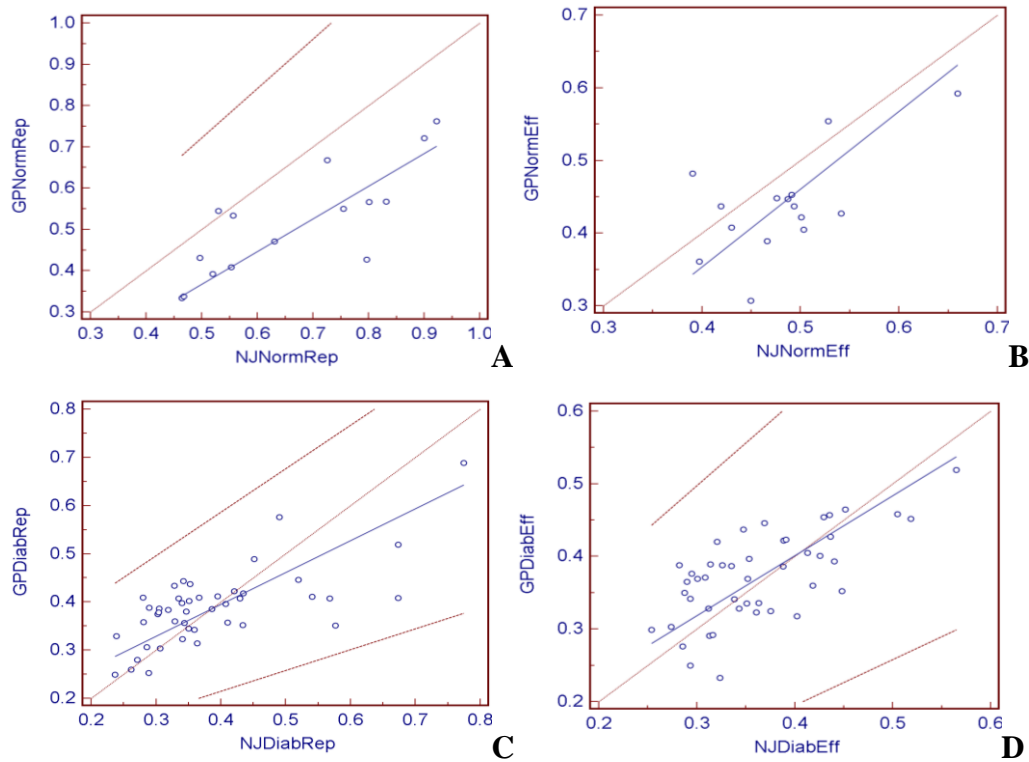


Figure 25 : Droites de régression obtenues avec le test de Passing & Bablok en comparant les deux méthodes d'analyse. A : patients normaux, au repos. B : patients normaux, à l'effort. C : patients diabétiques, au repos. D : patients diabétiques, à l'effort. Axe des abscisses : valeurs obtenues avec le programme originel. Axe des ordonnées : valeurs obtenues avec le programme spécifique.

	Normaux, Repos	Normaux, Effort	Diabétiques, Repos	Diabétiques, Effort
<b>Equation de régression</b>	$y = -0.02816 + 0.7916 x$	$y = -0.07490 + 1.0712 x$	$y = 0.1302 + 0.6620 x$	$y = 0.07017 + 0.8274 x$
<b>Intercept A</b>	-0.02816	-0.0749	0.1302	0.07017
<b>IC 95%</b>	-0.2527 to 0.1235	-1.0077 to 0.2110	0.04250 to 0.2260	-0.05710 to 0.1447
<b>Pente B</b>	0.7916	1.0712	0.662	0.8274
<b>IC 95%</b>	0.5525 to 1.1970	0.4582 to 2.9741	0.4312 to 0.9017	0.6302 to 1.1768
<b>Test CUSUM de linéarité</b>	Pas de déviation significative à la linéarité (P>0.10)	Pas de déviation significative à la linéarité (P>0.10)	Pas de déviation significative à la linéarité (P>0.10)	Pas de déviation significative à la linéarité (P>0.10)

Table 7 : Equations de régression, intervalles de confiance (IC) et test de linéarité du CUSUM obtenus avec le test de Passing & Bablok en comparant les deux programmes d'analyse.

#### ***2.1.1.4 Discussion***

L'analyse markovienne permet de calculer un index H à partir d'une image de la perfusion du myocarde, qui renseigne sur l'état de la perfusion par une unique valeur. Cette dernière varie entre 1 (inclus) et 0 (exclu), où une image avec un index H égal à 1 est une image complètement homogène, avec des pixels de même intensité, et une image avec un index H proche de 0 est une image très hétérogène.

Cette étude nous a permis d'adapter ce principe aux images tomographiques SPECT et de calculer cet index H par deux méthodes : le programme originel adapté aux images SPECT, et un programme développé spécifiquement pour ce travail. Les résultats obtenus en comparant une même population de patients traités avec ces deux méthodes montrent peu de différences dans les moyennes des index H des patients diabétiques au repos et à l'effort. Par contre, il a été observé une augmentation de la moyenne de ces index chez les patients normaux traités avec le logiciel originel. La différence entre les index des patients diabétiques et normaux se retrouve fortement augmentée, ce qui pourrait refléter la capacité du programme originel à fournir des valeurs sur une échelle plus large. Cette particularité pourrait être très importante dans la discrimination de scintigraphies anormales par rapport à des examens normaux.

D'autre part, une régression linéaire de Passing & Bablok ne met pas en évidence de différence significative entre ces deux méthodes, sauf dans le cas des patients diabétiques au repos. Par contre, dans tous les cas y compris ce dernier la relation linéaire entre les deux méthodes est significative. Cela pourrait indiquer que même si la corrélation n'est pas parfaite, les deux méthodes sont proches. Si le programme originel est considéré comme la méthode de référence, alors le programme spécifique devrait lui aussi être capable dans une certaine mesure d'analyser l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde. Une augmentation des effectifs pourrait améliorer la corrélation.

#### ***2.1.1.5 Conclusion***

Même si le programme originel semble plus performant et sera utilisé comme méthode de référence, le programme spécifique pourra être utilisé comme une méthode alternative dans l'analyse de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.

## **2.1.2 Evaluation de l'impact de l'activité du radiotracer sur l'index H**

### ***2.1.2.1 Introduction***

Cette seconde étude méthodologique propose d'évaluer l'évolution des valeurs de l'index H en fonction des activités de différents radiotraceurs, pour déterminer l'activité optimale à injecter lors des études expérimentales.

### ***2.1.2.2 Méthode***

Trois isotopes sont utilisés dans le cadre de cette étude : le  $^{201}\text{Tl}$ , le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , et le  $^{18}\text{F}$  Fluore ( $^{18}\text{F}$ ). Ce dernier est un émetteur de positon utilisé en imagerie PET. Ils sont tous utilisés sans subir de modification ou de marquage spécifique, et les activités souhaitées sont obtenues par des séries de dilution dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%). Des volumes de 1 ml pour chaque dilution de chaque isotope sont réparties dans des tubes de 1,5 ml (tube 3810, Eppendorf), à raison de 10 tubes pour le  $^{201}\text{Tl}$ , 5 tubes pour le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , et 5 tubes pour le  $^{18}\text{F}$ . Les activités ainsi obtenues dans chaque tube contenant 1 ml d'isotope sont présentées dans les résultats.

Pour chaque isotope, les tubes sont fixés dans un bloc de mousse, et l'imagerie tomographique SPECT haute résolution du  $^{201}\text{Tl}$  et du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  est effectuée en utilisant une caméra NanoSPECT (NanoSPECT/CT, Bioscan, Washington, United States) dédiée au petit animal, pendant 30 minutes (24 projections de 300 secondes), alors que l'imagerie tomographique PET haute résolution du  $^{18}\text{F}$  est effectuée en utilisant une caméra NanoPET (NanoPET/CT, Bioscan, Washington, United States) dédiée au petit animal, pendant 30 minutes.

Les images reconstruites obtenues ont été traitées avec le logiciel spécifique développé au laboratoire, comme décrit précédemment. En conséquence, l'index H a été calculé pour

chaque tube et exprimé par un nombre compris entre 0 et 1, avec une hétérogénéité plus importante pour des valeurs d'index H plus proches de 0.

### 2.1.2.3 Résultats

#### 2.1.2.3.1 Résultats obtenus avec le $^{201}\text{Tl}$

Les index H obtenus pour chaque tube en fonction de l'activité en  $^{201}\text{Tl}$  sont représentés dans la Table 8 et la Figure 26.

<b>Tube</b>	<b>Activité (MBq)</b>	<b>Index H</b>
<b>Tube 1</b>	89.7	1
<b>Tube 2</b>	49.1	0.926
<b>Tube 3</b>	25.7	0.989
<b>Tube 4</b>	14.2	0.737
<b>Tube 5</b>	7.7	0.786
<b>Tube 6</b>	6.3	0.799
<b>Tube 7</b>	3.7	0.568
<b>Tube 8</b>	1.9	0.575
<b>Tube 9</b>	1.1	0.522
<b>Tube 10</b>	0.6	0.433

Table 8 : Activité en  $^{201}\text{Tl}$  pour 1 ml contenu dans chaque tube et index H correspondant obtenu suite à l'imagerie tomographique SPECT haute résolution.

L'homogénéité mesurée augmente avec l'activité de l'isotope contenue dans le tube. En effet, l'index H est très faible lorsqu'il y a peu d'activité dans le tube, ce qui reflète une forte hétérogénéité apparente de l'image. Inversement, l'index H est bien plus élevé et proche de 1 pour les activités les plus importantes, ce qui reflète des images de plus en plus homogènes,

avec un maximum qui semble atteint pour les tubes 1, 2 et 3, et donc une activité supérieure à 25.7 MBq.

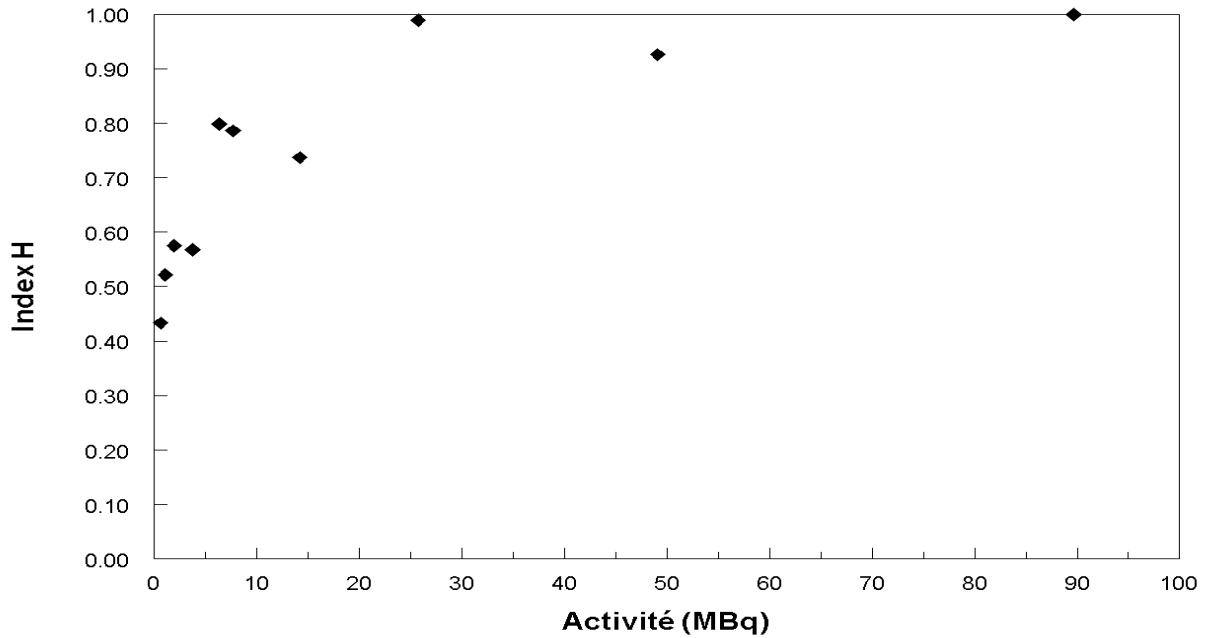


Figure 26 : Représentation des index H obtenus en fonction de l'activité en  $^{201}\text{Tl}$  de chaque tube.

### 2.1.2.3.2 Résultats obtenus avec le $^{99\text{m}}\text{Tc}$

<b>Tube</b>	<b>Activité (MBq)</b>	<b>Index H</b>
<b>Tube 1</b>	67.4	1
<b>Tube 2</b>	32.4	0.993
<b>Tube 3</b>	17.4	1
<b>Tube 4</b>	9.9	0.690
<b>Tube 5</b>	5.3	0.494

Table 9 : Activité en  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  pour 1 ml contenu dans chaque tube et index H correspondant obtenu suite à l'imagerie tomographique SPECT haute résolution.

Les index H obtenus pour chaque tube en fonction de l'activité en  $^{99m}\text{Tc}$  sont représentés dans la Table 9 et la Figure 27.

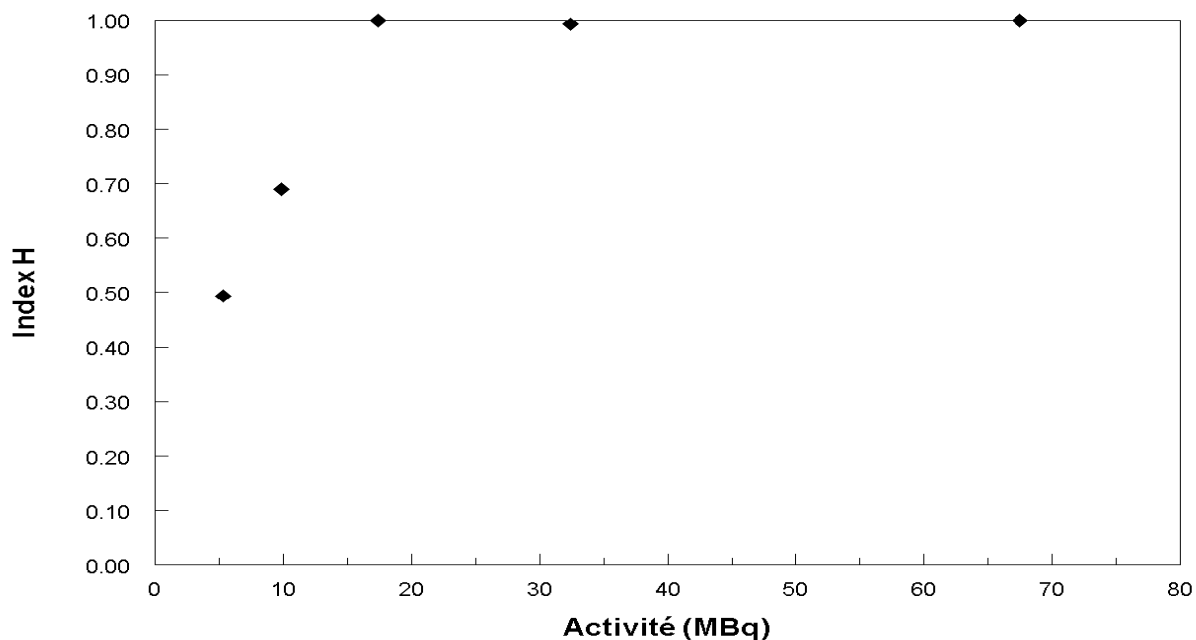


Figure 27 : Représentation des index H obtenus en fonction de l'activité en  $^{99m}\text{Tc}$  de chaque tube.

De la même façon que pour le  $^{201}\text{Tl}$ , l'homogénéité mesurée augmente avec l'activité en  $^{99m}\text{Tc}$  contenue dans le tube. En effet, l'index H est faible lorsqu'il y a peu d'activité dans le tube, ce qui reflète une image d'apparence plutôt hétérogène. Inversement, l'index H est bien plus élevé et très proche de 1 pour des activités plus importantes, ce qui reflète une image de plus en plus homogène, avec un maximum qui semble atteint pour les tubes 1, 2 et 3, et donc une activité supérieure à 17.4 MBq.

### 2.1.2.3.3 Résultats obtenus avec le $^{18}\text{F}$

Les index H obtenus pour chaque tube en fonction de l'activité en  $^{18}\text{F}$  sont représentés dans la Table 10 et la Figure 28.

<b>Tube</b>	<b>Activité (MBq)</b>	<b>Index H</b>
<b>Tube 1</b>	7.97	0.996
<b>Tube 2</b>	4.7	0.939
<b>Tube 3</b>	2.53	0.752
<b>Tube 4</b>	1.41	0.737
<b>Tube 5</b>	0.83	0.614

Table 10 : Activité en  $^{18}\text{F}$  pour 1 ml contenu dans chaque tube et index H correspondant obtenu suite à l'imagerie tomographique PET haute résolution.

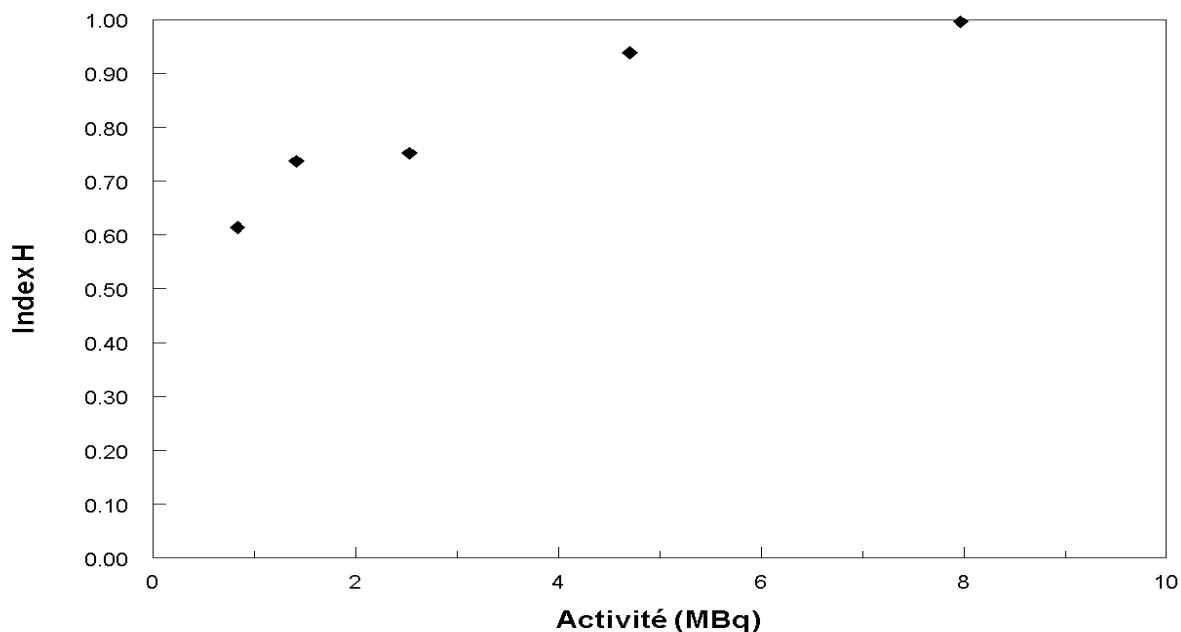


Figure 28 : Représentation des index H obtenus en fonction de l'activité en  $^{18}\text{F}$  de chaque tube.

De la même façon que pour le  $^{201}\text{Tl}$  et le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en SPECT, l'homogénéité mesurée en imagerie PET augmente avec l'activité en  $^{18}\text{F}$  contenue dans le tube. En effet, l'index H est faible lorsqu'il y a peu d'activité dans le tube, ce qui reflète une image d'apparence plutôt hétérogène. Inversement, l'index H est bien plus élevé et très proche de 1 pour des activités plus importantes, ce qui reflète une image de plus en plus homogène, avec un maximum qui semble atteint pour les tubes 1 et 2, et donc une activité supérieure à 4.7 MBq. Il est à noter



que cette activité minimale est plus faible que celles observées plus haut pour le  $^{201}\text{Tl}$  et le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

#### **2.1.2.4 Discussion**

Les résultats obtenus avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et le  $^{201}\text{Tl}$  indiquent une variation de l'hétérogénéité apparente en fonction de l'activité utilisée. Le type de tube et le volume de 1 ml ont été choisis pour se rapprocher et représenter approximativement le volume d'un cœur de rat. Dans cette situation, la variation des index H n'est donc due qu'à des phénomènes physiques de l'activité du radiotraceur, sans tenir compte des phénomènes physiologiques d'extraction.

Les index H obtenus avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et le  $^{201}\text{Tl}$  augmentent avec l'activité contenue dans le tube, ce qui signifie que l'homogénéité mesurée augmente avec l'activité du radiotraceur. Un plateau semble atteint avec le  $^{201}\text{Tl}$  pour une activité supérieure à 26 MBq, et pour une activité supérieure à 17 MBq avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , où les index H se retrouvent très proches de 1 et donc d'une homogénéité parfaite.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'augmentation de l'hétérogénéité pour de faibles activités. On peut tout d'abord imaginer que si une même image est divisée en un certain nombre de pixels alors que le contenu total de la somme des pixels reste constant, le contenu individuel des pixels va être soumis à un aléas statistique d'autant plus important que la taille des pixels est petite. Par ailleurs, d'autres phénomènes peuvent intervenir, comme un aléas de la détection radioactive en un point donné du détecteur, ou encore un aléas de la digitalisation de l'image par rapport aux limites topographiques des pixels. De plus, cette hétérogénéité est considérablement aggravée quand l'influence statistique de la désintégration radioactive devient sensible, c'est-à-dire pour une source de faible activité. Ceci explique la diminution de l'index H pour de faibles activités. Par ailleurs, on constate une inégalité d'efficacité dans l'analyse des résultats obtenus avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et le  $^{201}\text{Tl}$ . N'ayant pas accès au comptage brut de la caméra, nous ne pouvons que supposer à partir des valeurs obtenues que à activité égale, le  $^{201}\text{Tl}$  est moins bien détecté que le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , et donc génère plus d'aléas statistiques.

Ces facteurs responsables de l'hétérogénéité des images sont susceptibles de modifier l'image que l'on aurait dû observer de cause physiologique, ce qui limite en pratique l'analyse des phénomènes biologiques. Pour analyser correctement des hétérogénéités d'origine biologique,

on pourrait proposer de regrouper les pixels de façon à avoir une résolution moins fine, mais avec une certitude sur l'existence d'une hétérogénéité de la répartition spatiale du signal. Cependant, aucune fonction n'est disponible dans le logiciel d'analyse des images fourni avec la caméra pour permettre cette opération.

Cette étude nous permet donc de déterminer les doses optimales de radiotracer à utiliser lors des études expérimentales, qui théoriquement permettraient de ne pas induire une hétérogénéité artificielle pour des activités insuffisantes. A peu près 2% de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI de la dose injectée par gramme de tissu et 1.6% de  $^{201}\text{Tl}$  se retrouvent fixés dans le cœur (Riou 2006, Yu 2007). Si on considère qu'un cœur de rat pèse en moyenne 1 gramme, un calcul indique donc qu'il faudrait théoriquement injecter plus de 1625 MBq (44 mCi) de  $^{201}\text{Tl}$  pour avoir au moins 26 MBq fixé dans le cœur, et pour avoir au minimum 17 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI dans le cœur il faudrait injecter plus de 850 MBq (23 mCi).

A partir de ces résultats, l'imagerie de la perfusion du myocarde pour l'étude de l'hétérogénéité chez le rat avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI semble pouvoir se faire dans de bonnes conditions puisqu'il est aisé d'injecter plus de 740 MBq (20 mCi) à un rat. Dans cette situation, ce n'est donc plus l'activité du radiotracer qui détermine l'hétérogénéité de l'image. Cependant, il semble que l'étude de la perfusion au  $^{201}\text{Tl}$  soit limitée chez le rat. En effet, pour des raisons de volume injecté, il est difficile d'administrer plus de 150 MBq (à peu près 4 mCi) à un rat, puisque le  $^{201}\text{Tl}$  est fourni au mieux à une concentration de 2 mCi/ml. Pour une telle dose injectée, le cœur devrait théoriquement capter 2.4 MBq, ce qui correspondrait selon nos résultats précédents à un index H qui atteindrait au mieux une valeur entre 0.54 et 0.61. Malgré tout, ces résultats ne sont pas rédhibitoires pour l'utilisation du  $^{201}\text{Tl}$  dans nos expériences. En effet, le groupe de patients sains de l'étude de Johnson et Gould avait un index H de  $0.63 \pm 0.127$  (Johnson 2005). Il faudra cependant garder à l'esprit que les conditions semblent optimales avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, et plus limitées par la physique pour le  $^{201}\text{Tl}$ .

De la même façon que pour le  $^{201}\text{Tl}$  et le  $^{99m}\text{Tc}$  en SPECT, l'homogénéité mesurée en imagerie PET augmente avec l'activité contenue dans le tube. Comme attendu pour une caméra avec une meilleure sensibilité, les activités nécessaires pour atteindre une homogénéité maximale sont plus faibles que celles des radioéléments utilisés en imagerie SPECT.

### ***2.1.2.5 Conclusion***

Les résultats obtenus avec le  $^{99m}\text{Tc}$  et le  $^{201}\text{Tl}$  indiquent que l'homogénéité calculée augmente avec l'activité du radiotracer utilisé, pour finalement atteindre un maximum. Pour les expérimentations animales, les conditions semblent optimales avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, et pourraient être plus limitées pour le  $^{201}\text{Tl}$  dans l'étude de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde.

## ***2.2 Etude physiopathologique***

### **2.2.1 Introduction**

Cette étude expérimentale cherche à tester l'hypothèse que l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde pourrait être quantifiée en imagerie du petit animal SPECT, grâce à l'utilisation du  $^{201}\text{Tl}$  et du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI chez deux modèles animaux de diabète, et serait en corrélation avec des altérations du myocarde.

### **2.2.2 Méthode**

#### ***2.2.2.1 Animaux***

Deux modèles expérimentaux ont été choisis pour évaluer l'influence de la pathologie diabétique sur l'hétérogénéité de la perfusion myocardique chez le rat. Toutes les expérimentations réalisées sur ces deux modèles ont obtenu l'approbation d'un comité d'éthique (CNREEA, n° autorisation 38 05 39).

##### **2.2.2.1.1 Modèle de diabète de type 1**

Deux souches de rats non consanguins sont utilisées pour le premier modèle de diabète de type 1. Le protocole expérimental détaillé ci-dessous est résumé dans la Figure 29. Un premier groupe est composé de 39 rats mâles Sprague Dawley (Harlan) âgés de 9 semaines, dont 27 sont répartis dans le groupe STZ-5 et 12 dans le groupe CTRL-5 ( $303\pm 5$  vs  $313\pm 8$  g respectivement,  $P = \text{NS}$ ). Le second groupe comporte 35 rats mâles Wistar (Charles River) âgés de 9 semaines, dont 25 sont répartis dans le groupe STZ-9 et 10 dans le groupe CTRL-9 ( $336\pm 3$  vs  $332\pm 7$  g respectivement,  $P = \text{NS}$ ).

## Etude expérimentale

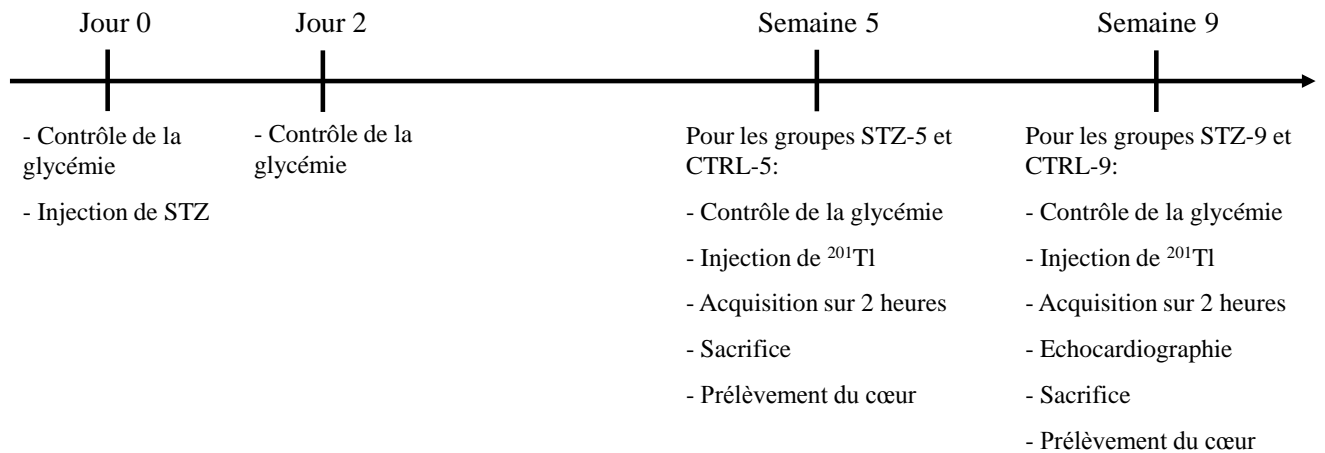


Figure 29 : Protocole expérimental du modèle de diabète de type 1.

Les rats éveillés sont maintenus dans un linge et un cathéter est placé dans une veine de la queue pour permettre un prélèvement sanguin et une mesure de la glycémie basale. Les rats subissent ensuite une injection intrapéritonéale de Streptozotocine (STZ) à 65 mg/kg, diluée dans un tampon citrate (pH 4,5) (STZ-5 et STZ-9). Le diabète de type 1 est provoqué par l'injection intrapéritonéale de STZ. La STZ est une toxine bactérienne qui détruit les cellules  $\beta$  du pancréas, créant ainsi une insulino-dépendance. Ce modèle a pour intérêt d'induire rapidement un diabète de type 1 et une hyperglycémie, provoquant par la suite des altérations du myocarde. Les rats contrôles ne reçoivent que le tampon citrate permettant de diluer la STZ (CTRL-5 et CTRL-9).

Deux jours plus tard, les rats éveillés sont maintenus dans un linge et un cathéter est placé dans une veine de la queue pour permettre un prélèvement sanguin et un contrôle de l'évolution de la glycémie. Les rats ne répondant pas à la STZ sont sacrifiés (STZ-5 n=11 et STZ-9 n=8).

L'imagerie de la perfusion myocardique est réalisée 5 semaines après injection de STZ pour les rats Sprague Dawley et 9 semaines après injection de la STZ pour les rats Wistar.

En parallèle, trois rats mâles Wistar (Charles River, 286±6 g) âgés de 8 semaines et n'ayant subi aucun traitement spécifique sont utilisés pour l'étude de la cinétique du <sup>201</sup>Tl dans le myocarde.

### 2.2.2.1.2 Modèle de diabète de type 2

Le second modèle expérimental est le rat Zucker Fatty (Charles River), qui est un modèle pathologique reconnu d'insulino-résistance (Poornima 2006). Le protocole expérimental détaillé ci-dessous est résumé dans la Figure 30. Ce groupe est composé de 5 rats mâles Zucker Fatty âgés de 18 semaines. Le groupe contrôle comporte 5 rats mâles Zucker Lean de 16 semaines. Ces rats sont simplement mis en stabulation à l'animalerie sans subir de traitement spécifique avant le protocole. L'imagerie de la perfusion myocardique est réalisée à l'âge de 36 semaines afin d'étudier le développement tardif d'anomalies de la microcirculation lors d'un diabète de type 2 chronique.

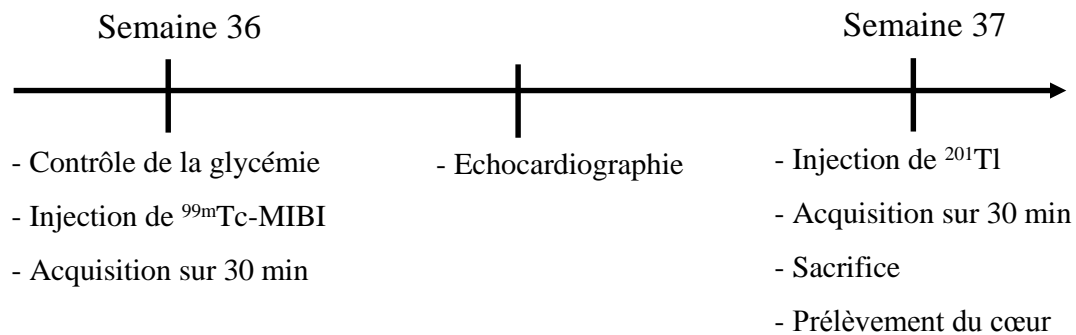


Figure 30 : Protocole expérimental du modèle de diabète de type 2.

Durant la stabulation et entre les phases d'expérimentation, tous les animaux seront placés à l'animalerie du laboratoire avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Préalablement à l'imagerie in vivo, tous les rats éveillés sont maintenus dans un linge et un cathéter est placé dans une veine de la queue pour permettre un prélèvement sanguin et, suite à la centrifugation du sang récolté, une mesure de la glycémie plasmatique.

### 2.2.2.2 Radiotraceurs utilisés

#### 2.2.2.2.1 $^{201}\text{Tl}$ (Thallium ( $^{201}\text{Tl}$ ))

Le  $^{201}\text{Tl}$  (Chlorure de thallium [ $^{201}\text{Tl}$ ], CIS bio International) obtenu est directement injecté en l'état, sans avoir à subir de marquage.

#### **2.2.2.2 Marquage du <sup>99m</sup>Techetium-MIBI (<sup>99m</sup>Tc-MIBI)**

Le lyophilisat stérile et apyrogène de Stamicis<sup>®</sup> contenant 1mg de tétrafluoroborate de tétrakis (2 métoxy-isobutyl isonitrile) cuivre (usuellement nommé MIBI), 0.075 mg de SnCl<sub>2</sub>, 1mg de chlorhydrate de L-cysteine monohydrate, 2.6mg de citrate de sodium et 20mg de mannitol, a été dissous directement dans son flacon par 3 ml (environ 2500 MBq) de solution de pertechnétate de sodium fraîchement éluee d'un générateur. Le produit est agité par retournement 5 à 10 fois, puis chauffé 10 minutes à 100°C (bloc chauffant à sec). Après 15 minutes de refroidissement à température ambiante, la préparation marquée a été contrôlée par chromatographie sur couche mince afin de déterminer la pureté radiochimique ; 2 à 5µl de préparation ont été déposés sur une plaque Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) gel de silice (2x10cm), les phases mobiles dans cette analyse étant une solution de NaCl 0.9% et de l'acétone. Dans la solution de NaCl 0.9% le MIBI et les impuretés restent au point de dépôt et le pertechnétate migre au front de solvant tandis que dans l'acétone, le MIBI et le pertechnétate migrent au front de solvant et les impuretés restent au point de dépôt. Les analyses montrent une pureté radiochimique supérieure à 95%.

#### **2.2.2.3 Imagerie in vivo**

##### **2.2.2.3.1 Modèle de diabète de type1**

A 5 semaines après injection de la STZ pour le groupe Sprague-Dawley, et à 9 semaines après injection de la STZ pour le groupe Wistar, les animaux sont anesthésiés par voie gazeuse à l'isoflurane (isoflurane<sup>®</sup>, 2 à 3% en inhalation: (RS)-2-chloro-2-(difluorométoxy)-1,1,1-trifluoro-éthane), et suite à une légère incision dans la patte inférieure, 143 ± 1 MBq de <sup>201</sup>Tl sont injectés à l'aide d'une seringue dans la veine saphène. L'incision est ensuite refermée par suture. La perfusion myocardique est évaluée par imagerie tomographique SPECT haute résolution en utilisant une gamma-caméra dédiée au petit animal d'une résolution spatiale de 0,9 mm (Gamma-imageur S <sup>®</sup>, Biospace Lab, Paris, France), en collimation de type mono-pinhole pendant 2 heures.

Le jour même ou dans les jours suivants, les animaux du groupe Wistar subissent une anesthésie légère par un mélange de xylazine (1/3 ; 10 mg/kg) et de kétamine (2/3 ; 100

mg/kg), pour la réalisation d'une étude d'échocardiographie. La morphologie et la fonction ventriculaire gauche ont été évaluées par échocardiographie en mode M grâce à l'utilisation d'une sonde de 12 MHz (Sonos® 5500, Philips Co, Eindhoven, Pays-Bas).

Suite à l'imagerie échographique *in vivo*, tous les rats sont euthanasiés par une dose létale de Sodium Pentobarbital. Le cœur est alors rapidement prélevé, rincé, pesé, puis congelé dans un bain de 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide pour des analyses ultérieures.

Les trois animaux dédiés à l'étude de la cinétique cardiaque du  $^{201}\text{Tl}$  sont anesthésiés par voie gazeuse à l'isoflurane (isoflurane®, 2 à 3% en inhalation: (RS)-2-chloro-2-(difluorométhoxy)-1,1,1-trifluoro-éthane), et suite à une légère incision dans la patte inférieure,  $4.2 \pm 0.2$  MBq de  $^{201}\text{Tl}$  sont injectés à l'aide d'une seringue dans la veine saphène. Une imagerie planaire SPECT du  $^{201}\text{Tl}$  est effectuée sur 150 minutes, à partir du moment de l'injection, en utilisant une gamma-caméra dédiée au petit animal (Gamma-imageur S®, Biospace Lab, Paris, France). Suite à l'imagerie *in vivo*, tous les rats sont euthanasiés par une dose létale de Sodium Pentobarbital.

#### **2.2.2.3.2 Modèle de diabète de type2**

Les rats Zucker Fatty et leurs contrôles subissent le protocole d'imagerie *in vivo* à l'âge de 36 semaines.

Pour la première partie du protocole d'imagerie nucléaire, les animaux sont anesthésiés par voie gazeuse à l'isoflurane (2 à 3%), et suite à une légère incision dans la patte inférieure,  $699 \pm 14$  MBq de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI sont injectés à l'aide d'une seringue dans la veine saphène. L'incision est ensuite refermée par suture. La perfusion myocardique est évaluée par imagerie tomographique SPECT haute résolution en utilisant une caméra NanoSPECT (NanoSPECT/CT, Bioscan, Washington, United States) dédiée au petit animal, pendant 30 minutes (24 projections de 300 secondes).

Durant la semaine entre le premier et le second passage en imagerie, les animaux subissent une anesthésie par voie gazeuse à l'isoflurane (2 à 3%) pour la réalisation d'une étude d'échocardiographie. La morphologie et la fonction ventriculaire gauche ont été évaluées par échocardiographie en mode M et Doppler grâce à l'utilisation d'une sonde de 13 à 24 MHz (MS250, VisualSonics, Canada).



Enfin, une semaine après l'injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, les animaux sont anesthésiés par voie gazeuse à l'isoflurane (2 à 3%), et suite à une légère incision dans la patte inférieure,  $156 \pm 2$  MBq de  $^{201}\text{Tl}$  sont injectés à l'aide d'une seringue dans la veine saphène. L'incision est ensuite refermée par suture. La perfusion myocardique est évaluée par imagerie tomographique SPECT haute résolution en utilisant une caméra NanoSPECT dédiée au petit animal, pendant 30 minutes (24 projections de 300 secondes).

Suite à l'imagerie *in vivo*, tous les rats sont euthanasiés par une dose létale de Sodium Pentobarbital. Le cœur est alors rapidement prélevé, rincé, pesé, puis congelé dans un bain de 2-méthylbutane refroidit à l'azote liquide pour des analyses ultérieures.

#### **2.2.2.4 Etude *ex vivo***

Des coupes petit axe de 8 microns d'épaisseur ont été effectuées pour chaque cœur grâce au cryotome Microm HM 505 E (Francheville, France) puis fixées dans l'acétone froid ( $-20^\circ\text{C}$ ) durant 20 minutes avant d'être exposées à l'air ambiant pour sécher.

La densité capillaire est évaluée à l'aide d'un marqueur de la protéine endothéliale CD31. L'activité peroxydasique endogène est tout d'abord éliminée par un bain de méthanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, puis le blocage des sites de fixation non spécifiques est réalisé par un bain contenant de l'avidine (kit de blocage Avidin/Biotin, Vector Laboratories) pendant 15 minutes. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps monoclonal murin anti-CD31 de rat (1/25, BD Biosciences, ref. #550300), du sérum de chèvre et le kit de blocage de la biotine, pendant 1 heure à température ambiante. Un anticorps biotinylé de chèvre anti-souris (1/1000, BD Biosciences, ref. #550337) avec du sérum de chèvre est appliqué sur les lames pendant 30 minutes à température ambiante. Une solution de streptavidine-peroxydase a ensuite été appliquée sur les échantillons pendant 30 minutes, et les coupes ont été colorées à l'aide d'une solution chromogène de diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories) pendant 5 minutes. Enfin, les échantillons sont déshydratés par une succession de bains d'éthanol 100% et de xylène et les lames sont montées à l'aide d'un liquide de montage en phase organique.

La fibrose du myocarde a été évaluée par coloration histologique à l'aide du colorant Rouge Sirius (Réactifs RAL, ref. MS363440). La solution de Rouge Sirius est préparée une journée à

l'avance (0.1g de Rouge Sirius pour 100ml de solution d'acide picrique à 1%). Suite à la réhydratation des lames, un bain dans la solution de Rouge Sirius est réalisé pendant 2 minutes et 30 secondes, puis les lames sont très rapidement rincées à l'eau courante (quelques secondes). Enfin, les échantillons sont déshydratés par une succession de bains d'éthanol 100% et de xylène et les lames sont montées à l'aide d'un liquide de montage en phase organique.

### ***2.2.2.5 Analyse des images***

#### **2.2.2.5.1 Images scintigraphiques**

L'analyse des images planaires de cinétique cardiaque du  $^{201}\text{Tl}$  est effectuée grâce au logiciel dédié GammaVision+ (Biospace Lab, Paris, France). Chaque acquisition est divisée en 50 images, chacune correspondant donc à une acquisition de 3 minutes. Une région d'intérêt est enfin tracée au niveau du cœur, et les activités au sein de cette zone sont calculées puis exprimées en pourcentage de l'activité initiale pour chacune des 50 images.

L'analyse markovienne de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde a été réalisée après reconstruction des images SPECT obtenues suite à l'injection de  $^{201}\text{Tl}$  ou de  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ .

Les images obtenues avec le modèle de diabète de type 1 ont été traitées avec le logiciel spécifique développé au laboratoire, comme décrit précédemment dans le chapitre 3 du travail expérimental. En effet, le format des images obtenues avec le Gamma-Imager est spécifique et ne permet pas un passage vers le logiciel originel.

Dans le cas des données obtenues avec le modèle de diabète de type 2 sur la caméra NanoSPECT, deux types de reconstruction ont été utilisés pour chaque acquisition : une reconstruction en utilisant les paramètres de base du logiciel, et une reconstruction en augmentant le filtre gaussien au maximum proposé par le logiciel (soit un filtre gaussien de 35% et de 60% respectivement, selon les critères du logiciel de reconstruction HiSPECT NG, SciVis GmbH, Göttingen, Germany). Les images reconstruites ont été envoyées au laboratoire du docteur en médecine Nils Johnson (Feinberg School of Medicine, North-Western University, Chicago, Illinois) et une analyse automatisée a été réalisée comme décrit précédemment dans le chapitre 1 du travail expérimental (Gould 2000, Johnson 2005).

En conséquence, l'index H a été calculé pour chaque animal et exprimé par un nombre compris entre 0 et 1, avec une hétérogénéité plus importante pour des valeurs d'index H plus proches de 0.

#### **2.2.2.5.2 Echocardiographie**

Pour le modèle animal de diabète de type 1, les données acquises lors de l'échocardiographie in vivo en mode TM du ventricule gauche (VG) sont: le diamètre du VG (LVID), l'épaisseur de la paroi antérieure (LVAW), et de la paroi postérieure (LVPW), en fin de diastole et fin de systole (d et s respectivement). La fraction d'éjection du VG sera calculée.

Pour le modèle animal de diabète de type 2, les données acquises lors de l'échocardiographie in vivo du VG en mode TM sont: le diamètre du VG, l'épaisseur de la paroi antérieure et de la paroi postérieure en fin de diastole et fin de systole, le diamètre de la chambre de chasse, le diamètre aortique à l'origine, et le diamètre de l'oreillette gauche. La fraction de raccourcissement, et la fraction d'éjection du VG seront calculées, de même que le volume et la masse théorique du VG. Enfin, des mesures de doppler mitral et aortique seront effectuées.

Les formules nécessaires pour les calculs sont les suivantes :

$$\text{Volume du VG en diastole : } LV \text{ Vol;d} = (7.0 / (2.4 + LVID;d)) LVID;d^3$$

$$\text{Volume du VG en systole : } LV \text{ Vol;s} = (7.0 / (2.4 + LVID;s)) LVID;s^3$$

$$\text{Masse du VG : } LV \text{ Mass} = 1.053 ((LVID;d + LVPW;d + LVAW;d)^3 - LVID;d^3)$$

$$\text{Fraction d'éjection : } EF = 100 ((LV \text{ Vol;d} - LV \text{ Vol;s}) / LV \text{ Vol;d})$$

$$\text{Fraction de raccourcissement : } FS = 100 ((LVID;d - LVID;s) / LVID;d)$$

#### **2.2.2.5.3 Histologie et immunohistologie**

Pour la densité capillaire, une analyse des images agrandies est réalisée grâce au module Integrated Morphometry Analysis du logiciel Metamorph (Metamorph 7.5, Molecular Devices Inc, CA, Etats-Unis) sur des zones de 300x300µm. Le logiciel permet de mesurer des objets en les séparant sur des critères définissables par l'utilisateur, basés sur une combinaison de paramètres morphométriques, comme la forme, la taille et la densité optique. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de capillaires/mm<sup>2</sup> de tissu.

La surface occupée par la fibrose est numériquement évaluée sur des photos agrandies de chaque coupe (X200), suite à un traitement d'image et à l'aide d'un logiciel d'analyse (ImageJ Software, Open Source, National Institutes of Health, United States), et est exprimée pour chaque animal en pourcentage moyen de la fibrose par coupe.

### 2.2.2.6 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Un test t de Student est utilisé lors des comparaisons de deux groupes de valeurs non appariées. Les tests sont réalisés avec le logiciel Systat (Systat Software Inc.).

Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

## 2.2.3 Résultats obtenus avec le modèle de diabète de type 1

### 2.2.3.1 Paramètres généraux

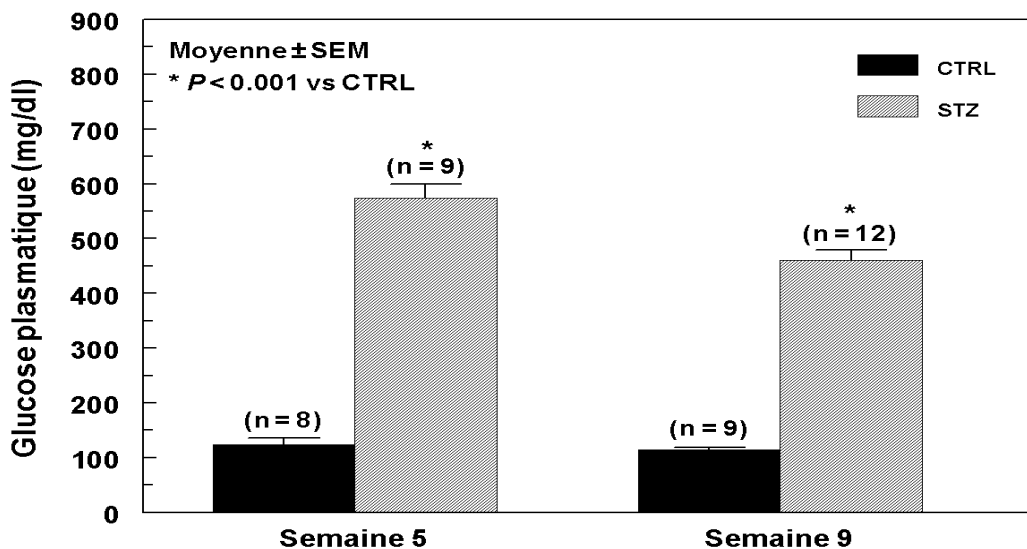


Figure 31 : Glycémie plasmatique à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.

L'induction du diabète de type 1 a provoqué une augmentation significative du glucose plasmatique chez les animaux des groupes STZ-5 ( $573 \pm 26$  vs  $124 \pm 11$  mg/dl,  $P < 0.001$ ) et STZ-9 ( $460 \pm 20$  vs  $114 \pm 4$  mg/dl,  $P < 0.001$ ) (Figure 31).

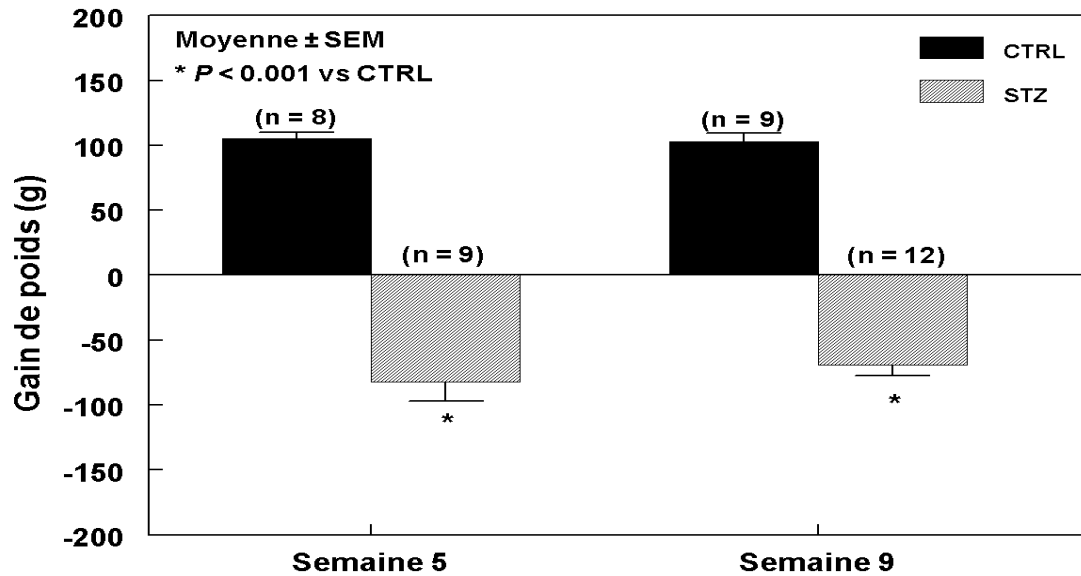


Figure 32 : Evolution du poids à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I, par rapport au poids initial avant injection de STZ.

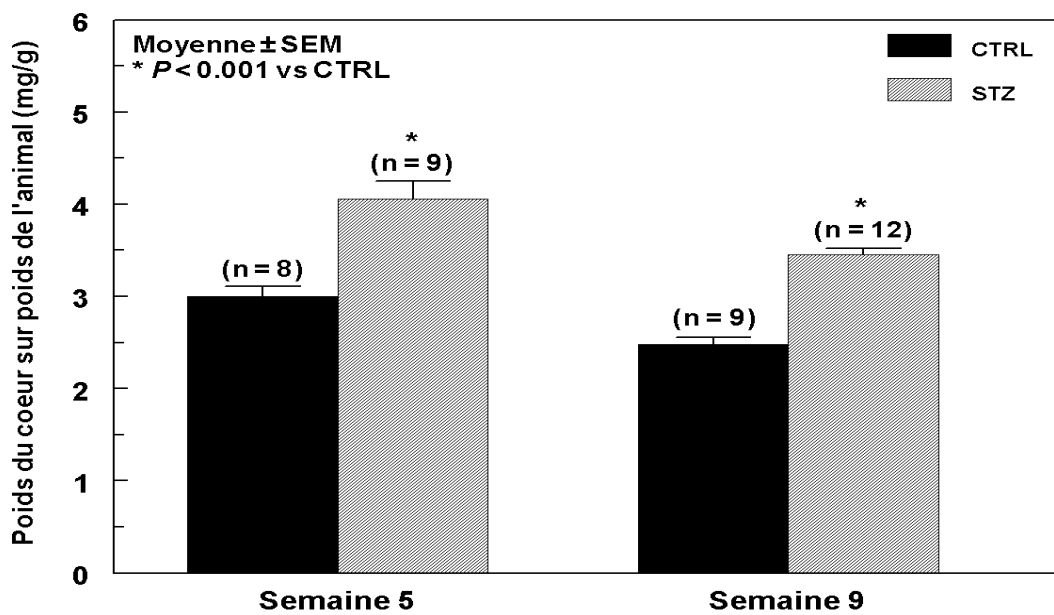


Figure 33 : Rapport du poids du cœur par rapport au poids corporel à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.

De plus, il a aussi été observé chez les animaux diabétiques une diminution significative de la masse corporelle par rapport au poids initial de l'animal (STZ-5  $-82 \pm 15$  g vs  $+105 \pm 5$  g,  $P < 0.001$  ; STZ-9  $-69 \pm 8$ g vs  $+102 \pm 6$ g,  $P < 0.001$ ), et une augmentation significative du rapport entre le poids du cœur et la masse corporelle (STZ-5  $4.1 \pm 0.2$  mg/g vs  $3.0 \pm 0.1$  mg/g,  $P < 0.001$  ; STZ-9  $3.5 \pm 0.1$  mg/g vs  $2.5 \pm 0.1$  mg/g,  $P < 0.001$ ) (Figures 32 et 33).

### 2.2.3.2 Morphologie et fonction du ventricule gauche par échocardiographie

L'épaisseur des parois du ventricule gauche en systole et en diastole, évaluée par échocardiographie, est similaire entre les groupes STZ-9 et CTRL-9, alors que le diamètre de la cavité du ventricule gauche est significativement plus petit chez le groupe diabétique ( $0.66 \pm 0.01$  cm vs  $0.78 \pm 0.02$  cm,  $p < 0.001$ ). La fraction de raccourcissement augmente légèrement mais significativement chez le groupe diabétique ( $47 \pm 2\%$  vs  $40 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 11).

	CTRL (n = 5)	STZ (n = 8)
<b>LVAW;s</b>	$0.25 \pm 0.01$	$0.24 \pm 0.01$
<b>LVID;s</b>	$0.47 \pm 0.01$	$0.35 \pm 0.02$ **
<b>LVPW;s</b>	$0.25 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.01$
<b>LVAW;d</b>	$0.14 \pm 0.00$	$0.13 \pm 0.01$
<b>LVID;d</b>	$0.78 \pm 0.02$	$0.66 \pm 0.01$ **
<b>LVPW;d</b>	$0.15 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.01$
<b>HR</b>	$265 \pm 7$	$242 \pm 8$
<b>FS %</b>	$40 \pm 1$	$47 \pm 2$ *

Table 11: Moyennes et SEM des paramètres obtenus en échocardiographie chez le modèle animal de diabète de type 1, à 9 semaines suite à l'induction du diabète. LVAW : paroi antérieure ; LVPW : paroi postérieure ; LVID : diamètre interne du ventricule gauche ; s : en systole ; d : en diastole ; HR : fréquence cardiaque ; FS : fraction de raccourcissement. \*

$P < 0.05$  versus CTRL ; \*\*  $P < 0.001$  versus CTRL.

### 2.2.3.3 Fibrose

Aucune différence significative n'a été observée dans l'étendue de la fibrose du myocarde entre les groupes diabétiques et contrôles, à 5 et 9 semaines après induction du diabète (STZ-5 :  $10.2 \pm 0.8\%$  vs  $10.2 \pm 1.0\%$ ,  $P = \text{NS}$  ; STZ-9 :  $10.3 \pm 0.6\%$  vs  $9.9 \pm 0.6\%$ ,  $P = \text{NS}$ ) (Figures 34 et 35).

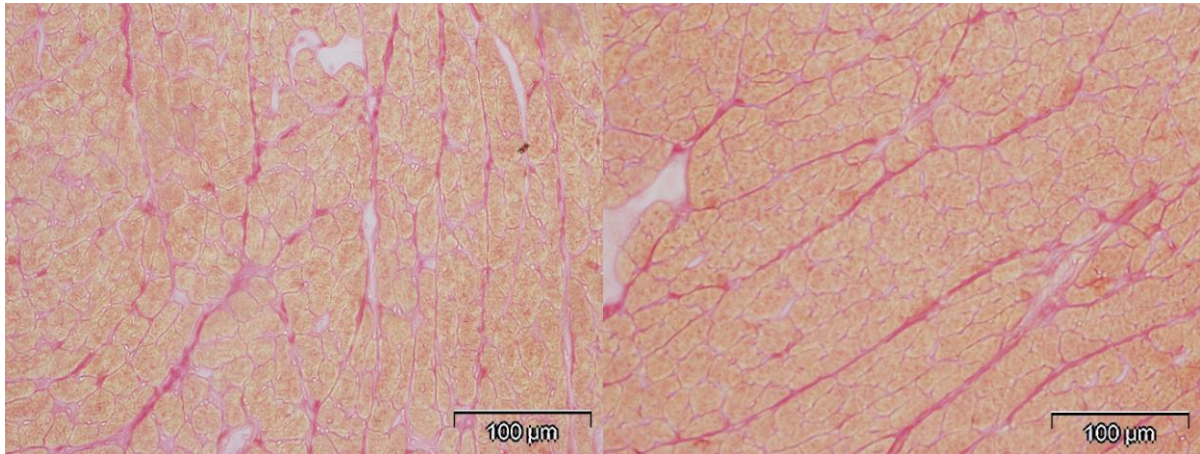


Figure 34 : Exemples de coupes marquées au Rouge Sirius. La fibrose apparaît en rouge. A gauche : animal contrôle ; A droite : animal diabétique.

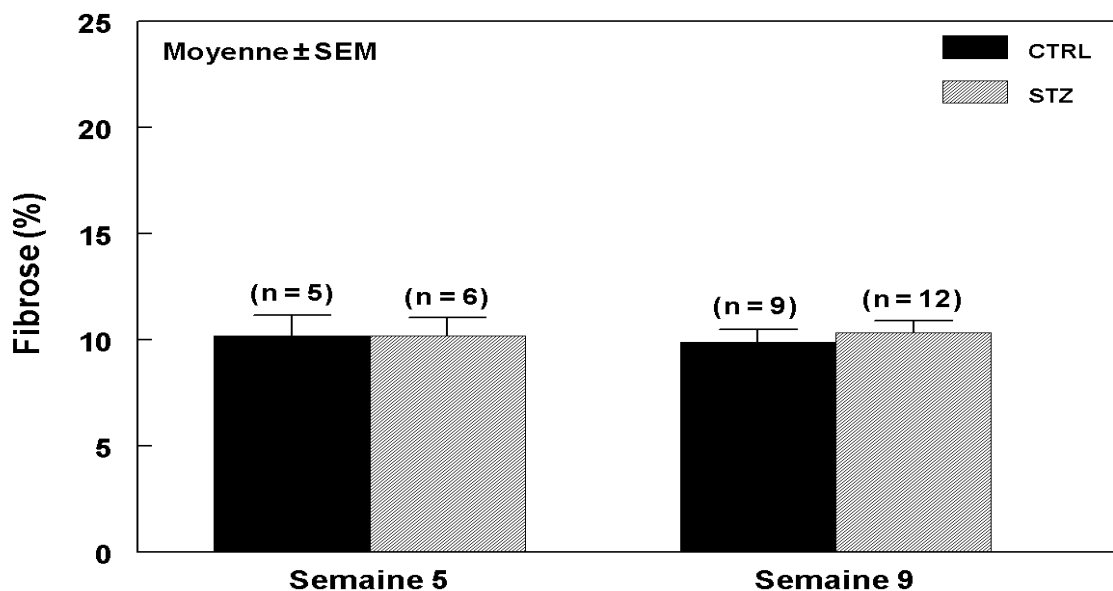


Figure 35 : Pourcentages moyens de fibrose observés à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type 1.

### 2.2.3.4 Densité capillaire

Aucune différence significative n'a été observée dans la densité capillaire du myocarde entre les groupes diabétiques et contrôles, à 5 et 9 semaines après induction du diabète (STZ-5  $3184 \pm 140$  vs  $3004 \pm 117$  cap/mm<sup>2</sup>, P = NS ; STZ-9  $2815 \pm 47$  vs  $2718 \pm 81$  cap/mm<sup>2</sup>, P = NS) (Figures 36 et 37).

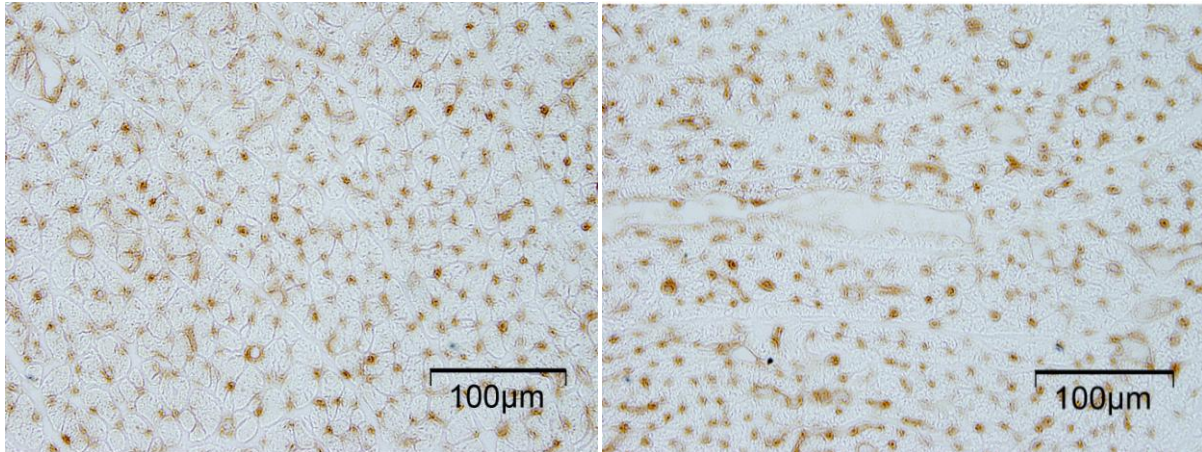


Figure 36 : Exemples de coupes ayant subies un marquage dirigé contre CD31. Le marquage apparaît en marron, et permet l'observation des capillaires. A gauche : animal contrôle ; A droite : animal diabétique.

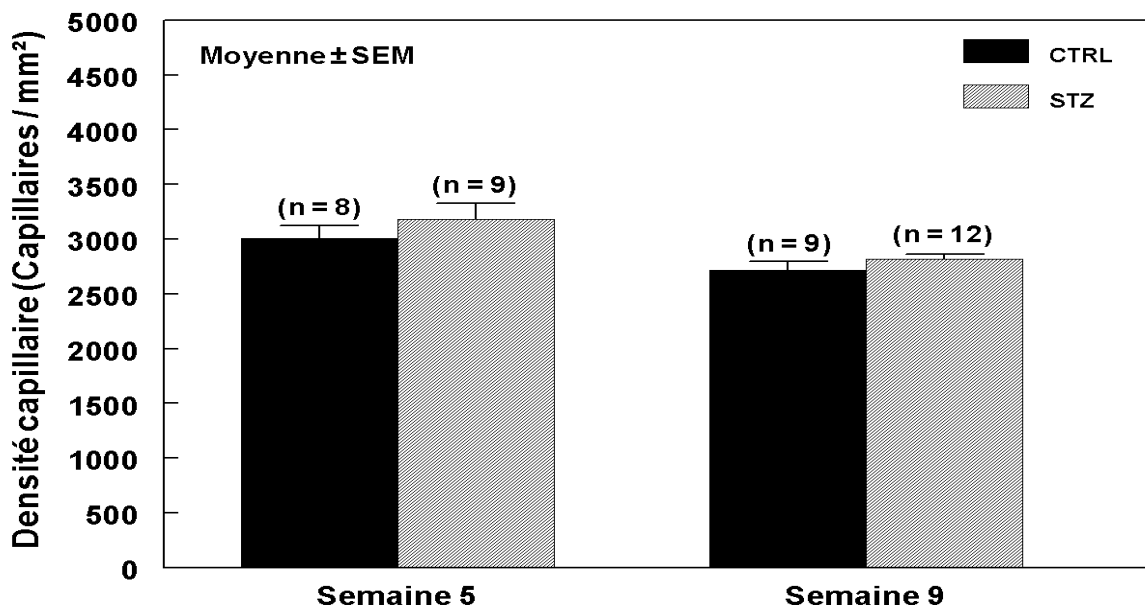


Figure 37 : Densité capillaire à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.



### 2.2.3.5 Imagerie scintigraphique et index d'hétérogénéité

L'imagerie planaire SPECT in vivo de la cinétique cardiaque du  $^{201}\text{Tl}$  chez trois rats témoins indique une diminution sanguine rapide de l'activité en  $^{201}\text{Tl}$  jusqu'à 40 minutes, suivie d'une diminution myocardique plus lente et stable jusqu'à la fin de l'acquisition, à 150 minutes après l'injection du traceur (Figure 38). L'activité du  $^{201}\text{Tl}$  est donc relativement stable dans le myocarde sur plus de deux heures après injection, ce qui correspond à la durée de l'acquisition des images tomographiques SPECT analysées ci-dessous.

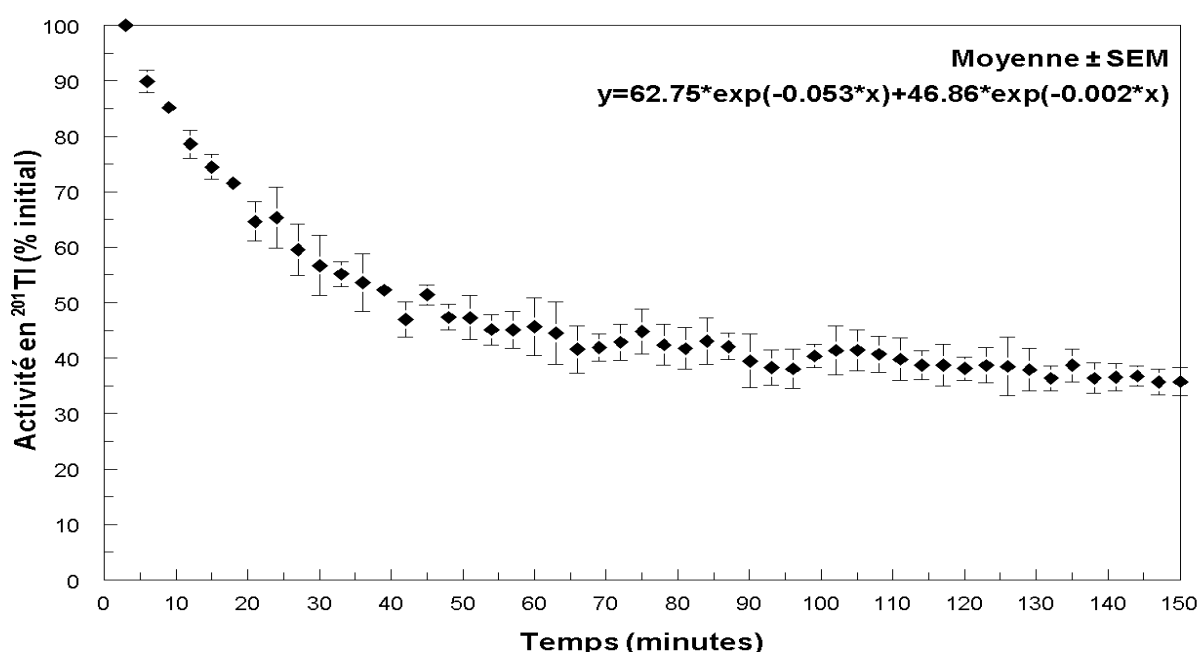


Figure 38 : Cinétique cardiaque du  $^{201}\text{Tl}$ .

L'analyse des images du myocarde obtenues in vivo par imagerie SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  n'a montré aucune différence significative des index d'hétérogénéité entre les groupes diabétiques et contrôles à 5 semaines ( $0.44\pm 0.04$  vs  $0.46\pm 0.03$ , respectivement,  $P = \text{NS}$ ) et à 9 semaines après induction du diabète ( $0.47\pm 0.02$  vs  $0.46\pm 0.05$ , respectivement,  $P = \text{NS}$ ) (Figure 39).

Finalement, aucune corrélation significative n'a été observée entre la densité capillaire ou la fibrose du myocarde d'une part et l'index H d'autre part ( $R=0.42$ ,  $P = \text{NS}$ , et  $R=0.03$ ,  $P = \text{NS}$ , respectivement) (Figures 40 et 41).

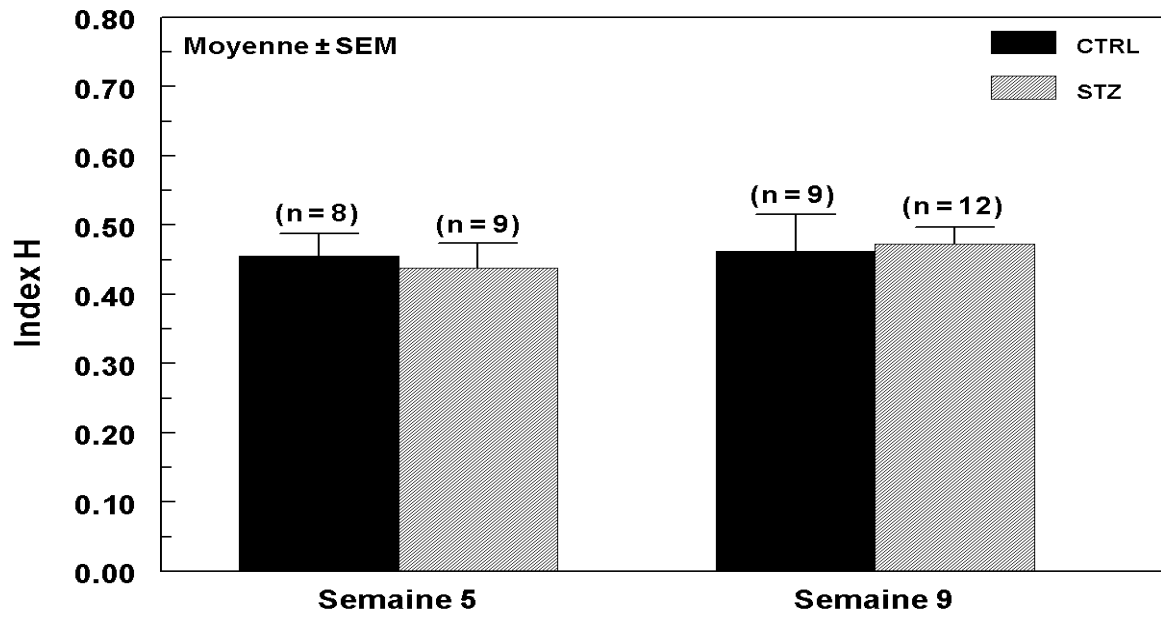


Figure 39 : Hétérogénéité de la perfusion myocardique à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.

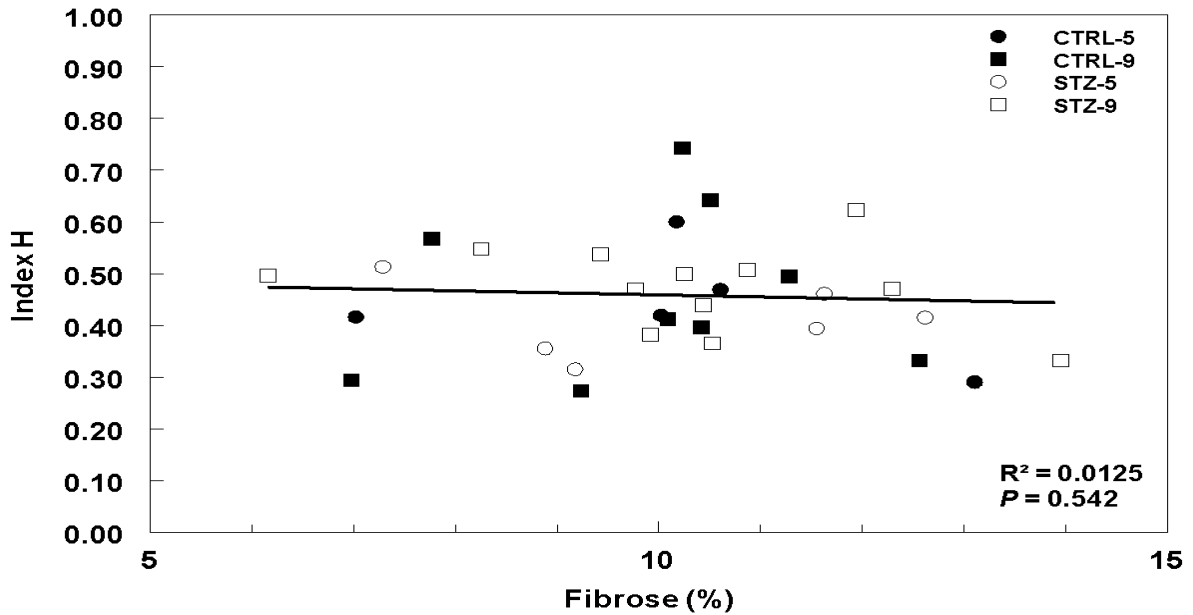


Figure 40 : Corrélation entre les index H et le pourcentage de fibrose à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.

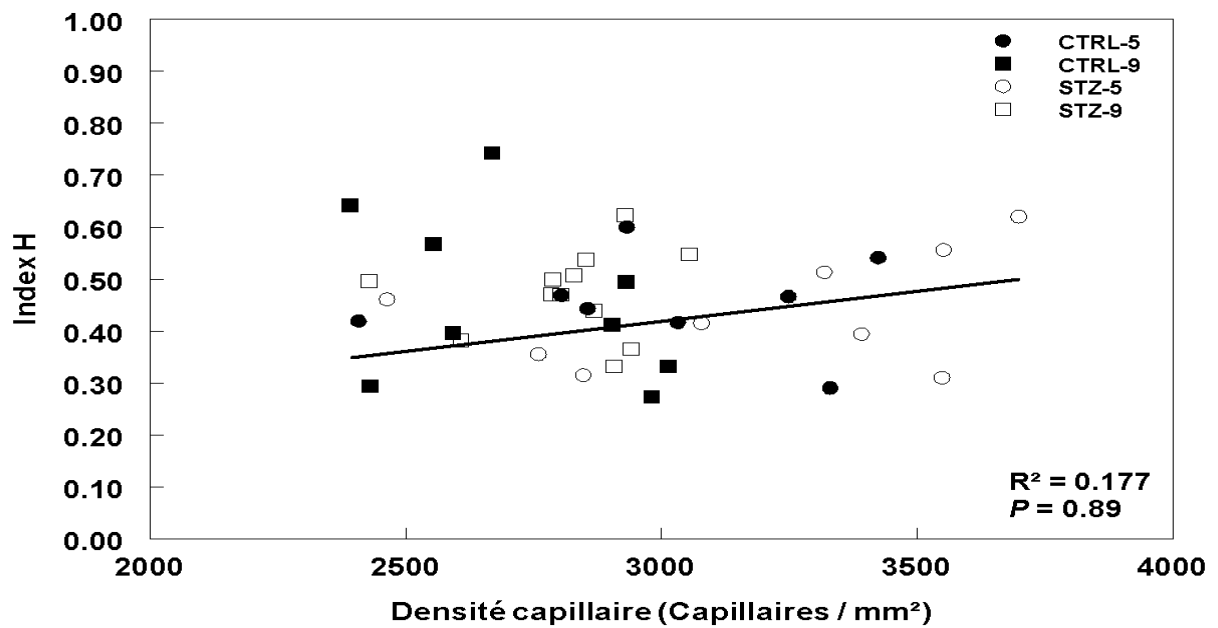


Figure 41 : Corrélation entre les index H et la densité capillaire à 5 et 9 semaines après induction du diabète de type I.

## 2.2.4 Résultats obtenus avec le modèle de diabète de type 2

### 2.2.4.1 Paramètres généraux

La résistance à l'insuline n'a pas provoqué une augmentation significative du glucose plasmatique chez les animaux Zucker Fatty à l'âge de 36 semaines ( $127 \pm 3$  vs  $116 \pm 8$  mg/dl,  $P = \text{NS}$ ) (Figure 42).

Par contre, il a été observé chez ces mêmes animaux une augmentation significative de la masse corporelle par rapport à leurs témoins respectifs ( $702 \pm 20$  g vs  $478 \pm 6$  g,  $P < 0.001$ ), et une augmentation significative du poids total du cœur ( $1.61 \pm 0.07$  g vs  $1.35 \pm 0.03$  g,  $P < 0.05$ ) (Figures 43 et 44).

La combinaison de ces résultats indique une diminution significative du rapport entre le poids du cœur et la masse corporelle chez les animaux Zucker Fatty par rapport à leurs témoins respectifs ( $2.4 \pm 0.1$  mg/g vs  $2.9 \pm 0.1$  mg/g,  $P < 0.01$ ) (Figure 45).

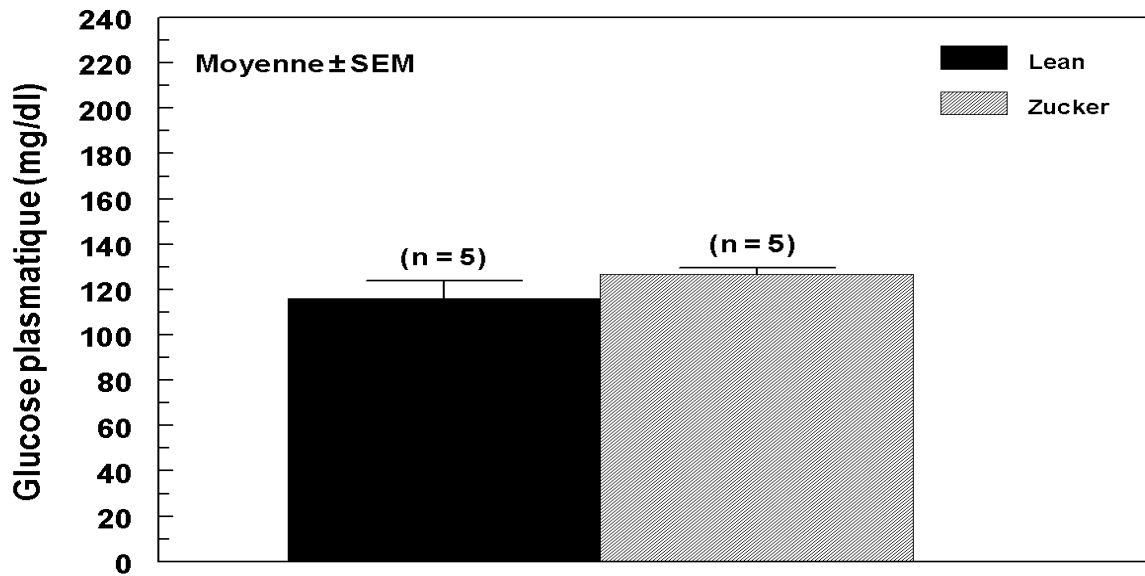


Figure 42 : Glycémie plasmatique des animaux diabétiques de type 2.

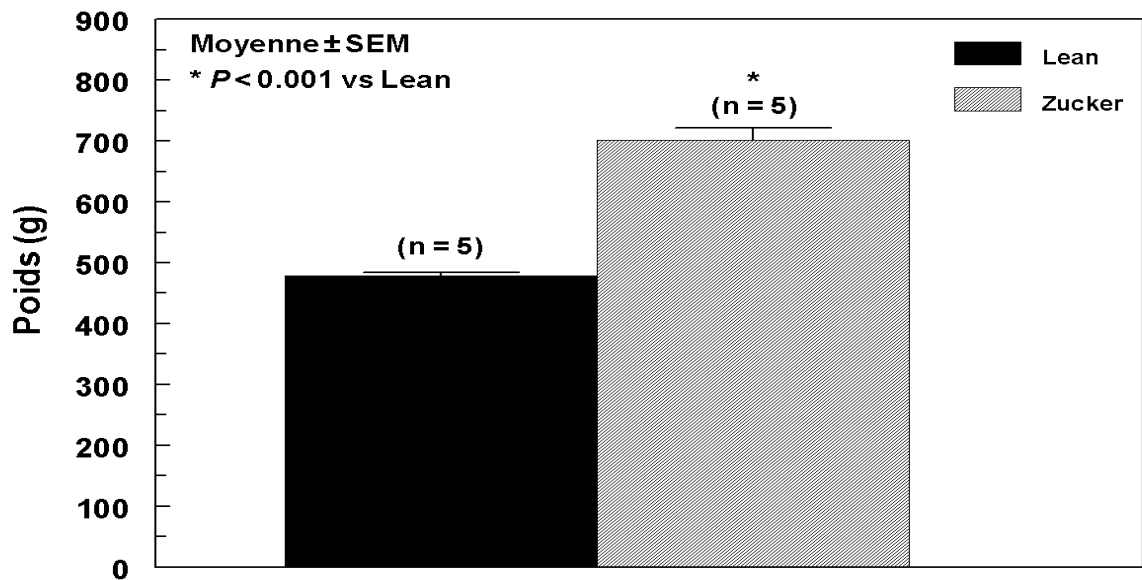


Figure 43 : Poids des animaux diabétiques de type 2.

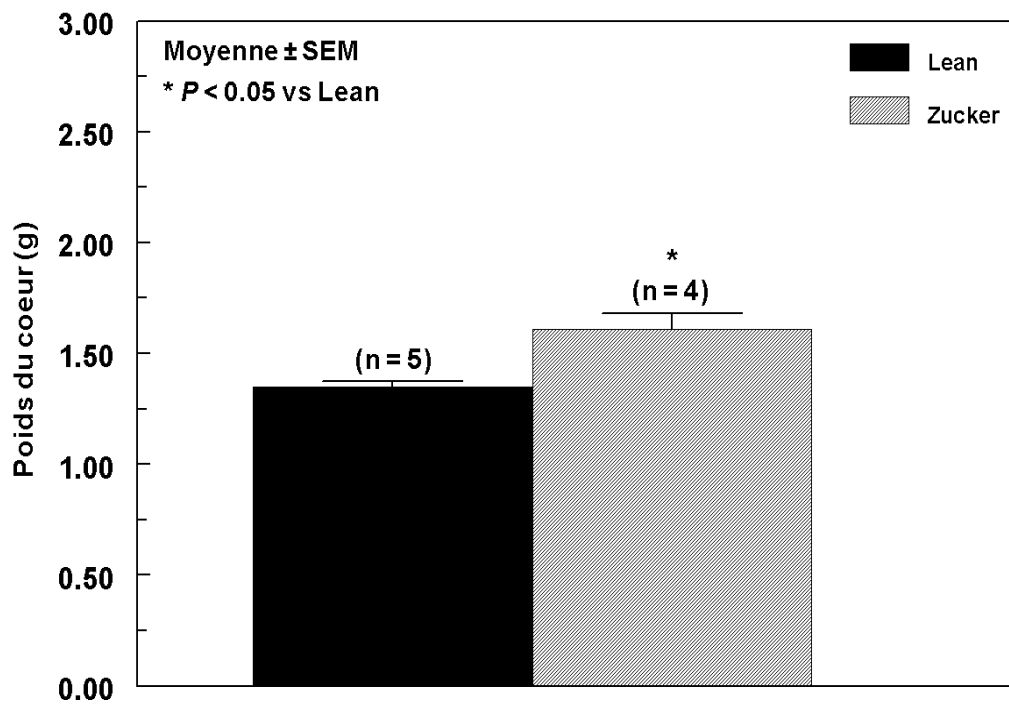


Figure 44 : Poids du cœur des animaux diabétiques de type 2.

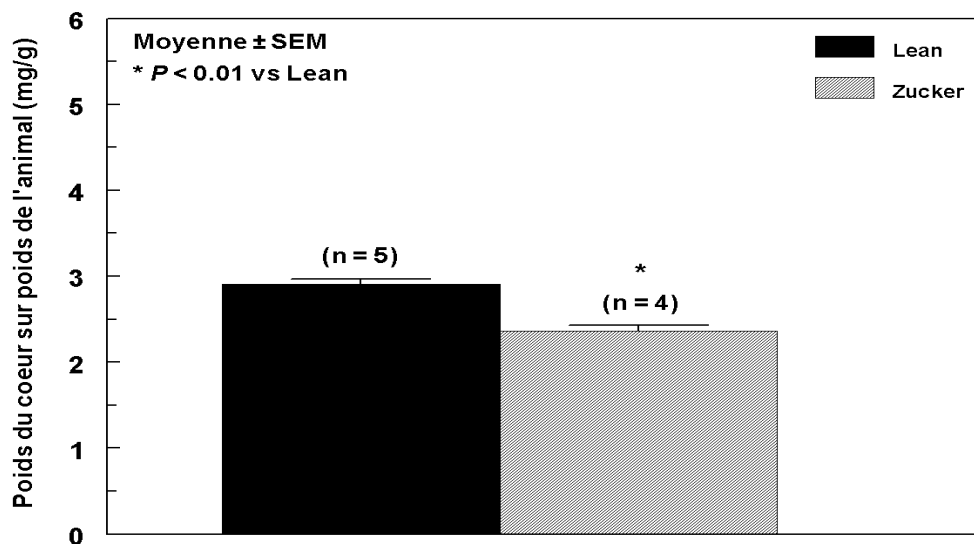


Figure 45 : Rapport du poids du cœur par rapport au poids corporel des animaux diabétiques de type 2.

**2.2.4.2 Morphologie et fonction du ventricule gauche par échocardiographie**

	<b>Lean (n=5)</b>	<b>Zucker (n=5)</b>
<b>MV A (mm/s)</b>	345 ± 54	480 ± 38
<b>MV E (mm/s)</b>	501 ± 96	567 ± 93
<b>MV E/A</b>	1.44 ± 0.13	1.15 ± 0.12
<b>LVOT VTI (mm)</b>	19.41 ± 2.47	23.39 ± 1.55
<b>LVOT (mm)</b>	2.82 ± 0.07	2.72 ± 0.07
<b>LVAW;d (mm)</b>	1.57 ± 0.06	1.79 ± 0.16
<b>LVAW;s (mm)</b>	2.80 ± 0.15	3.02 ± 0.17
<b>LVID;d (mm)</b>	7.66 ± 0.21	8.42 ± 0.34
<b>LVID;s (mm)</b>	4.50 ± 0.34	4.93 ± 0.30
<b>LVPW;d (mm)</b>	1.65 ± 0.16	1.95 ± 0.10
<b>LVPW;s (mm)</b>	2.44 ± 0.18	3.06 ± 0.07 *
<b>EF (%)</b>	69.88 ± 4.39	70.12 ± 2.71
<b>FS (%)</b>	41.34 ± 3.63	41.48 ± 2.42
<b>LV Mass (mg)</b>	887 ± 75	1262 ± 55 **
<b>LV Vol;d (ul)</b>	314 ± 19	389 ± 35 **
<b>LV Vol;s (ul)</b>	96 ± 18	117 ± 16
<b>Ao Root (mm)</b>	3.80 ± 0.09	3.92 ± 0.04
<b>LA (mm)</b>	4.28 ± 0.20	4.41 ± 0.32
<b>HR</b>	311 ± 19	305 ± 10

Table 12 : Moyennes et SEM des paramètres obtenus en échocardiographie chez le modèle animal de diabète de type 2. MV : valve mitrale ; LVOT : diamètre de la chambre de chasse ; VTI : intégrale temps-vitesse ; LVAW : paroi antérieure ; LVPW : paroi postérieure ; LVID : diamètre interne du ventricule gauche ; s : en systole ; d : en diastole ; EF : fraction d'éjection ; FS : fraction de raccourcissement ; LV Vol : volume du ventricule gauche ; Ao Root : Diamètre aortique à l'origine ; LA : Diamètre de l'oreillette gauche ; HR : fréquence cardiaque. \* P<0.05 versus Lean ; \*\* P<0.01 versus Lean.

Les mesures et les calculs obtenus à partir de l'analyse par échocardiographie sont présentés dans la Table 12. A l'exception de l'épaisseur de la paroi postérieure en systole qui est significativement plus grande pour les rats Zucker obèses, aucune moyenne des mesures effectuées en mode TM n'est significativement différente entre les animaux diabétiques et leurs contrôles. Cependant, nous pouvons noter que les dimensions pariétales et cavitaires

augmentent chez les rats Zucker obèses. Cette tendance se retrouve dans les calculs du volume du VG en diastole et de la masse du VG qui augmentent significativement chez les animaux diabétiques par rapport aux animaux sains ( $389\pm 35$  vs  $314\pm 19$   $\mu\text{l}$ , et  $1.26\pm 0.06$  vs  $0.89\pm 0.08$  g, respectivement,  $P < 0.01$ ). Il n'y a par contre pas de différence significative dans la fraction de raccourcissement, ni dans la fraction d'éjection entre les deux groupes.

Les mesures obtenues en mode Doppler ne montrent pas de différences significatives, même si on peut noter un rapport des ondes E/A plus faible pour le groupe Zucker obèse. D'autre part, l'observation des SEM indiquent que les mesures semblent souffrir d'une grande variabilité.

### 2.2.4.3 Fibrose

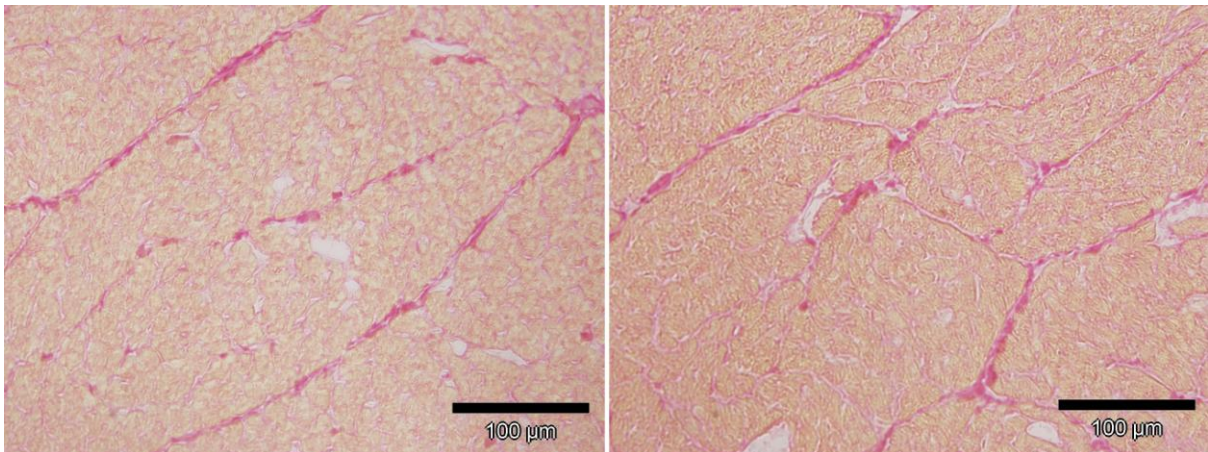


Figure 46 : Exemples de coupes marquées au Rouge Sirius. La fibrose apparaît en rouge. A gauche : Zucker Lean ; A droite : Zucker Fatty.

Aucune différence significative n'a été observée dans l'étendue de la fibrose du myocarde entre les groupes Zucker et Lean, à l'âge de 36 semaines ( $3.9\pm 0.2\%$  vs  $3.9\pm 0.3\%$ ,  $P = \text{NS}$ ) (Figures 46 et 47).

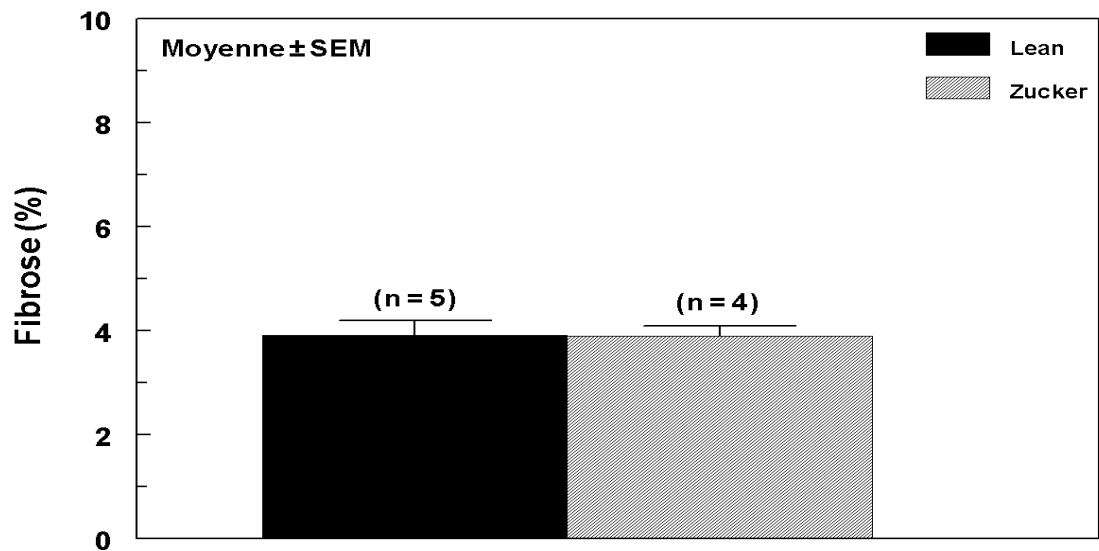


Figure 47 : Pourcentages moyens de fibrose observés.

#### 2.2.4.4 Densité capillaire

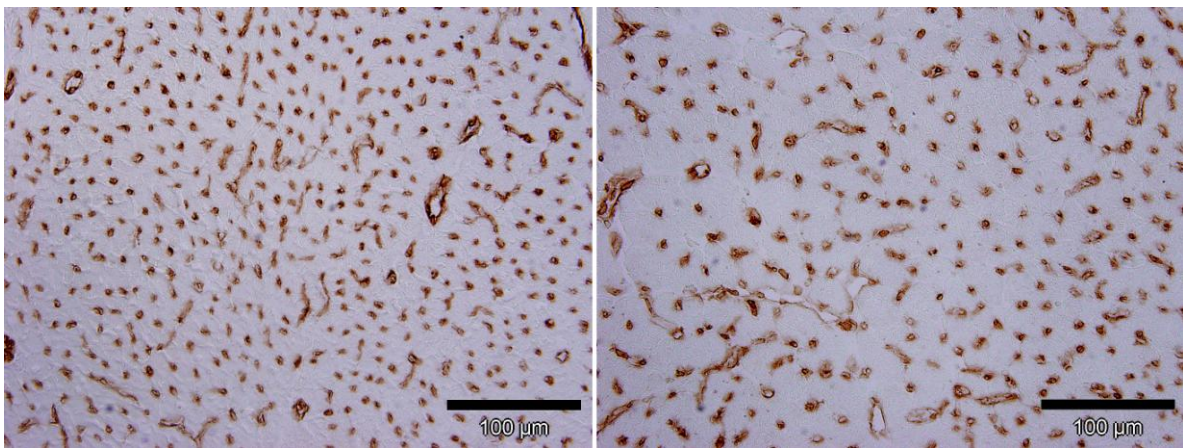


Figure 48 : Exemples de coupes ayant subies un marquage dirigé contre CD31. Le marquage apparaît en marron, et permet l'observation des capillaires. A gauche : Zucker Lean ; A droite : Zucker Fatty.

Une différence significative a été observée dans la densité capillaire du myocarde entre les groupes Zucker et Lean, à l'âge de 36 semaines, avec une diminution du nombre de capillaires



par mm<sup>2</sup> chez les animaux résistants à l'insuline (2446±56 vs 3156±67 cap/mm<sup>2</sup>, P < 0.001) (Figures 48 et 49).

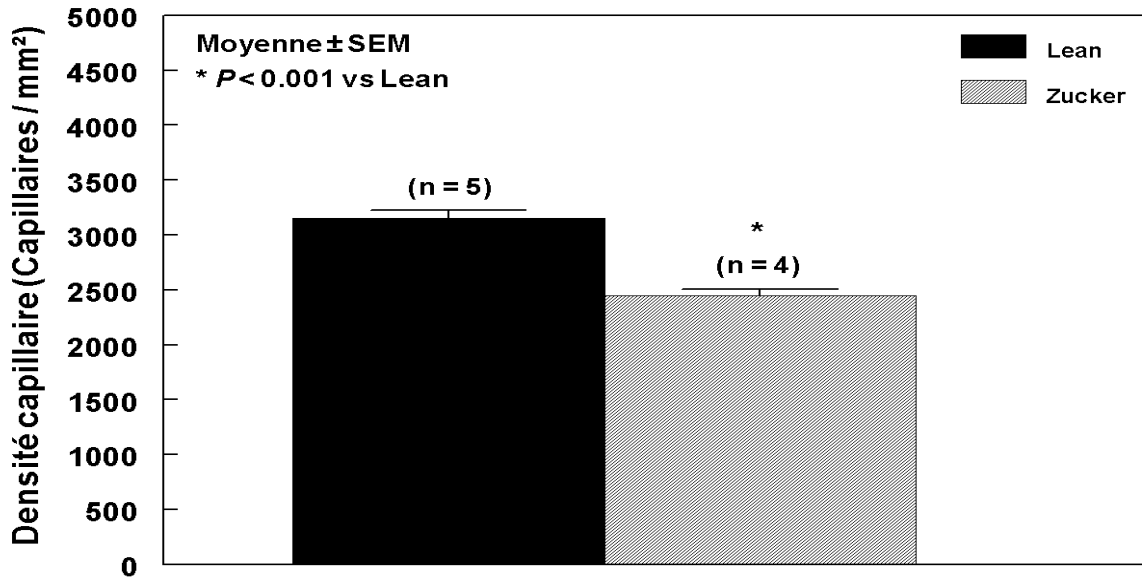


Figure 49 : Densités capillaires moyennes observées.

#### 2.2.4.5 Index d'hétérogénéité

L'analyse des images de perfusion du myocarde obtenues in vivo par imagerie SPECT avec le <sup>99m</sup>Tc-MIBI n'a montré aucune différence significative des index d'hétérogénéité entre les groupes Zucker Fatty et Zucker Lean âgés de 36 semaines, que les images soient traitées avec les paramètres de base du logiciel de reconstruction (0.32±0.02 vs 0.31±0.02, respectivement, P = NS) ou en appliquant le filtre à sa valeur maximale (0.40±0.02 vs 0.36±0.02, respectivement, P = NS) (Figure 50).

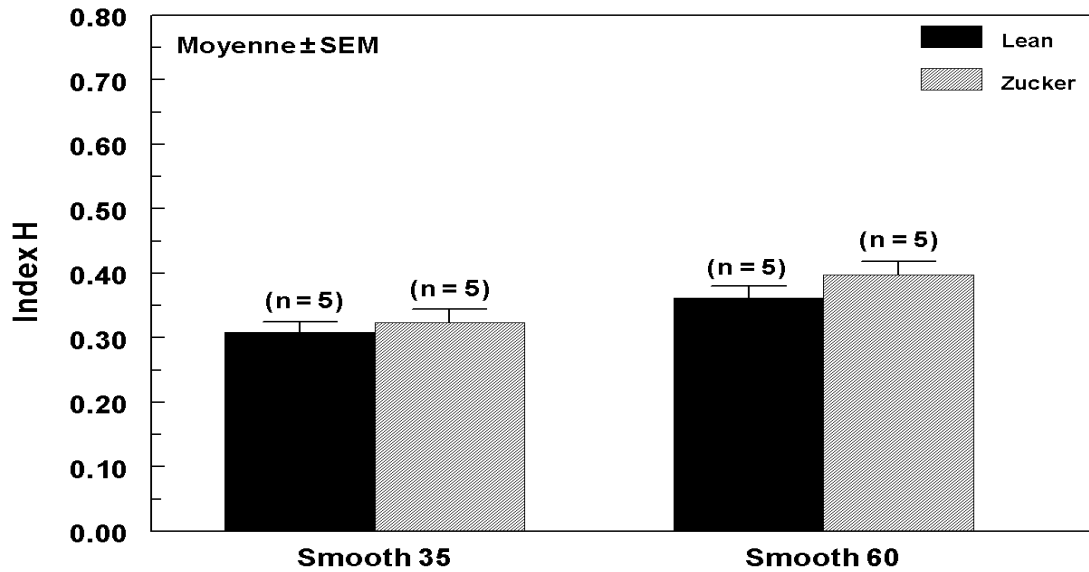


Figure 50 : Hétérogénéité de la perfusion myocardique observée suite à l'injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, à partir d'images traitées avec les paramètres de base du logiciel de reconstruction (Smooth 35) ou en appliquant le filtre à sa valeur maximale (Smooth 60).

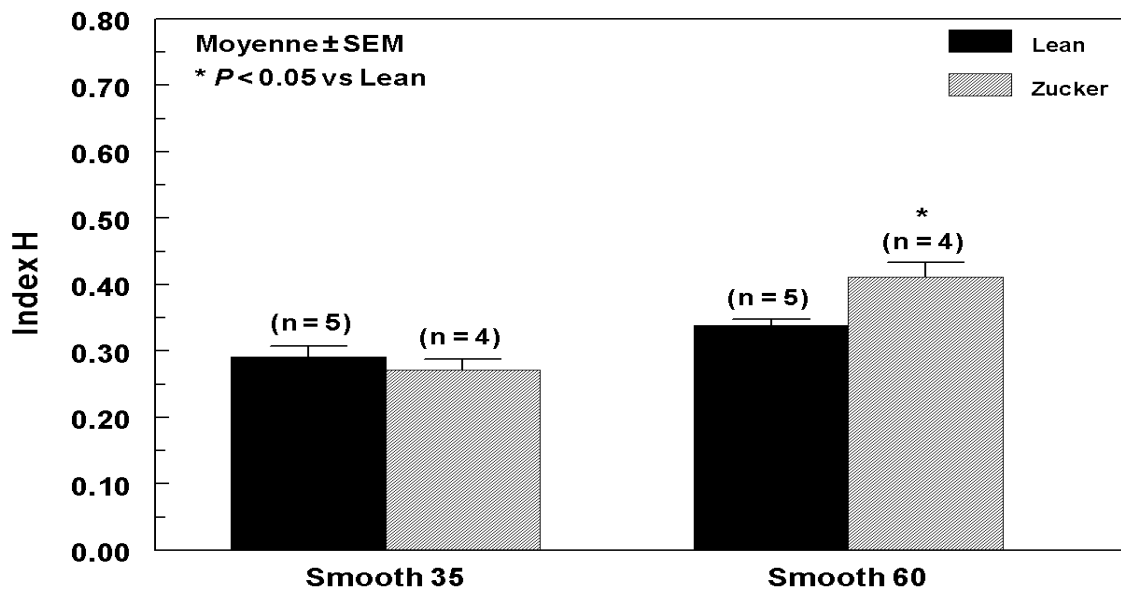


Figure 51 : Hétérogénéité de la perfusion myocardique observée suite à l'injection de  $^{201}\text{Tl}$ , à partir d'images traitées avec les paramètres de base du logiciel de reconstruction (Smooth 35) ou en appliquant le filtre à sa valeur maximale (Smooth 60).

De façon similaire, l'analyse des images de perfusion du myocarde obtenues in vivo par imagerie SPECT avec le  $^{201}\text{Tl}$  n'a montré aucune différence significative des index

d'hétérogénéité entre les groupes Zucker Fatty et Zucker Lean âgés de 37 semaines, à partir des images traitées avec les paramètres de base du logiciel de reconstruction ( $0.27\pm 0.02$  vs  $0.29\pm 0.02$ , respectivement,  $P = \text{NS}$ ). Cependant, en appliquant aux images de perfusion un filtre à sa valeur maximale, les index H des animaux Zucker Fatty sont significativement plus élevés que ceux de leurs témoins respectifs ( $0.41\pm 0.02$  vs  $0.34\pm 0.01$ , respectivement,  $P < 0.05$ ), ce qui indiquerait des images de perfusion plus homogènes chez les animaux résistants à l'insuline (Figure 51).

## 2.2.5 Discussion

Le premier modèle expérimental utilisé dans cette étude est un des modèles les plus courants pour l'étude du diabète de type 1 (Boudina 2007). Ce modèle a pour intérêt d'induire rapidement un diabète de type 1, grâce à l'utilisation de la STZ qui est une toxine bactérienne ciblant spécifiquement et provoquant la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas. Les changements métaboliques comportent le développement rapide et important d'une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie modeste, une cétose, et une diminution marquée du niveau d'insuline plasmatique. Ce modèle est particulièrement utile pour l'observation des effets de l'hyperglycémie en absence d'hyperinsulinémie (Poornima 2006). Il a de plus été clairement établi la présence d'une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères coronaires chez ce modèle, qui se manifeste déjà à 4 semaines après l'induction du diabète de type 1 par la STZ (Tawfik 2006). Pour ce travail, nous avons donc choisi un modèle de rat non consanguin Sprague-Dawley à 5 semaines après injection de STZ, et un modèle de Wistar à 9 semaines après injection de STZ, en se référant à différentes publications qui observaient des altérations dans la structure et la fonction du myocarde (Warley 1995, Jesmin 2007).

Comme largement décrit dans les études utilisant ce modèle de diabète de type 1, il a été observé au cours de ce travail une augmentation de la glycémie, une diminution du poids corporel et une augmentation du rapport entre le poids du cœur et le poids de l'animal. Nous n'avons trouvé qu'une subtile différence dans les paramètres échocardiographiques du ventricule gauche entre les rats témoins et diabétiques. Nos résultats ont mis en évidence une diminution des dimensions cavitaires et, paradoxalement à ce qui a été publié, une augmentation de la fraction de raccourcissement chez les animaux à 9 semaines après

l'induction du diabète, ce qui marque une absence de dysfonction systolique. En effet, pour Jesmin et coll. la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie en mode M a diminué dans les 5 semaines après induction du diabète par STZ par rapport aux animaux témoins non diabétiques, la fraction de raccourcissement du ventricule gauche et le débit cardiaque étant significativement plus faibles chez les rats diabétiques, traduisant une dysfonction systolique. Aucune différence significative n'avait été constatée pour le diamètre du ventricule gauche en fin de diastole, la pression systolique, et l'épaisseur de la paroi postérieure et septale entre les rats diabétiques et contrôles. Par ailleurs, le diamètre du ventricule gauche en fin de systole était significativement plus élevé chez les animaux diabétiques, ce qui reflète une modification de la fonction diastolique (Jesmin 2007).

D'autre part, aucune différence n'a été mise en évidence pour la fibrose et la densité capillaire du myocarde entre les animaux des groupes diabétiques et contrôles à 5 et 9 semaines après induction du diabète. Ces résultats en contradiction avec des études précédentes ayant montré une détérioration de la densité capillaire chez des rats ayant un diabète de type 1 induit par STZ ont été obtenus pour des résultats similaires sur les autres paramètres (Warley 1995, Jesmin 2007). Jesmin et coll. ont noté une diminution de 25% de la densité capillaire des coronaires d'animaux diabétiques 5 semaines après injection de STZ, par un marquage à la lectine. Une autre étude avait aussi mis en évidence une augmentation significative de la fibrose par un marquage au Rouge Sirius 6 semaines suite à l'injection de STZ (Van Linthout 2007). Finalement, l'hétérogénéité de perfusion myocardique in vivo évaluée par SPECT au Thallium 201 n'a pas montré de différence entre les rats diabétiques et non diabétiques dans notre étude. Bien que ce résultat soit en opposition avec notre hypothèse principale, elle est compatible avec l'absence de différence dans la structure vasculaire et myocardique entre les deux groupes d'animaux.

Malgré des résultats similaires avec la littérature pour certains paramètres, plusieurs discordances sont observées, et compliquent l'interprétation des résultats obtenus. Deux hypothèses pourraient expliquer ces différences entre nos résultats et des données publiées antérieurement. Tout d'abord, des rapports indiquent que 5 à 9 semaines ne sont pas suffisantes pour provoquer une insuffisance du myocarde. Il a été démontré que le diabète induit par STZ était initialement associé à une atrophie du myocarde due à une perte des protéines contractiles et à une baisse du nombre de myocytes, mais avec une faible fibrose réparatrice (Poornima 2006). Yoon et coll. ont rapporté dans un modèle animal similaire que la fibrose intracardiaque se développe tardivement. Ainsi une fibrose périvasculaire et interstitielle a été observée de 8 à 12 semaines après induction du diabète, avec un

développement ultérieur plus important de la fibrose interstitielle, conduisant à une surface de fibrose significativement plus importante chez le groupe diabétique que le groupe contrôle à 8 mois (Yoon 2005). De façon similaire, nous nous attendions à une diminution de la densité capillaire comme observée par Jesmin et coll. (Jesmin 2007), mais l'étude de Yoon et coll. a noté par un marquage du CD31 que la densité capillaire diminuait significativement chez les rats diabétiques à partir de 6 mois après l'induction du diabète. Finalement, Yoon et coll. ont relevé une détérioration de la fonction cardiaque au cours du temps. Cependant, la dysfonction diastolique précédait la dysfonction systolique. En effet, la fonction diastolique évaluée par Doppler mitral s'est graduellement dégradée pour devenir significative à 3 mois après l'induction du diabète. Par la suite, la dysfonction systolique évaluée par la fraction de raccourcissement n'était apparue que chez 25% des animaux étudiés, avec une mise en place à 6 mois après l'injection de STZ. Nous pouvons donc supposer que le délai choisi pour notre étude était trop court pour permettre un développement significatif d'altérations dans la structure et la fonction du myocarde. Deuxièmement, les modèles animaux de diabète de type 1 induit pourraient ne pas être les plus appropriés pour l'étude de la cardiomyopathie diabétique (Poornima, 2006). En effet, le diabète de type 2 implique des mécanismes supplémentaires : les trois caractéristiques des perturbations métaboliques du diabète de type 2 sont l'hyperlipidémie (notamment l'augmentation des triglycérides et des acides gras non estérifiés), l'hyperinsulinémie précoce, pour aboutir finalement à la défaillance des cellules  $\beta$  du pancréas conduisant éventuellement à l'hyperglycémie. Le diabète de type 1 se distingue principalement du diabète de type 2 dans le fait qu'il n'est pas accompagné par une période de résistance à l'insuline et d'hyperinsulinémie et se caractérise par une hyperglycémie précoce. Les effets de l'augmentation des acides gras non estérifiés, de l'insuline, et de la glycémie peuvent être considérés comme des déclencheurs des altérations cardiaques dans le diabète. Les acides gras non estérifiés jouent un rôle crucial dans le déclenchement de la résistance à l'insuline cellulaire, et sont aussi impliqués dans le développement de la dysfonction contractile du myocarde. Les acides gras non estérifiés jouent un rôle central dans la modification de la signalisation cellulaire par l'insuline par le biais de plusieurs mécanismes conduisant à l'insulino-résistance, puis à une hyperinsulinémie compensatoire. À son tour, l'hyperinsulinémie est un déclencheur important pour le développement de l'hypertrophie cardiaque au sein de la cardiomyopathie diabétique. La nature et l'étendue de la résistance cellulaire à l'insuline peuvent être limitées à certains systèmes de l'organisme et peuvent varier en fonction des actions métaboliques, mitogéniques, favorisant la survie, et vasculaire de l'insuline. L'hyperinsulinémie systémique peut accentuer l'action cellulaire de l'insuline au

niveau des tissus sensibles à l'insuline, tels que le myocarde, qui ne manifeste pas de résistance cellulaire à l'insuline. Les actions mitogéniques de l'insuline sur le myocarde au cours de l'hyperinsulinémie systémique sont directement impliquées dans l'hypertrophie cardiaque communément observée dans la cardiomyopathie diabétique (Poornima 2006).

En conséquence, nous avons également reproduit ce protocole expérimental avec un modèle de diabète de type 2 qui est le rat Zucker obèse, qui affiche une dysfonction ou une absence dans l'homéostasie de la leptine et développe une résistance à l'insuline associée à une hyperlipidémie et une obésité, avec une hyperglycémie tardive (Khavandi 2009, Poornima 2006). Des études *in vivo* avec ces rongeurs ont mis en évidence des dysfonctions systolique et diastolique, et un risque accru d'ischémie en liaison avec les changements structurels et fonctionnels du ventricule gauche. Entre autre, une augmentation des lipides intramyocardique et une augmentation de la masse du myocarde conduisent à l'hypertrophie. Il a été aussi clairement établi la mise en place d'une dysfonction endothéliale impliquant plusieurs niveaux des voies de signalisation, qui intervient à un âge avancé chez ces animaux (Katakam 2005, Picchi 2006, Villalba 2009). Par exemple, Oltman et coll. ont noté une augmentation significative des radicaux libres chez des animaux âgés d'au moins 16 semaines, suivi d'une diminution de la réponse vasodilatatrice des artères coronaires à l'acétylcholine dépendante de l'endothélium à partir de 28 semaines (Oltman 2006). Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle de rat Zucker obèse à un âge avancé de 36 semaines pour permettre l'étude de la perfusion lors de la mise en place d'altérations dans la structure et la fonction du myocarde (Toblli 2003, Toblli 2005)

Au cours de ce travail, une augmentation significative du poids des animaux résistants à l'insuline a été observée, associée à l'hyperlipidémie et l'obésité. Une diminution du rapport entre le poids du cœur et le poids de l'animal a été mesurée, mais il faut relativiser ce résultat aux poids particulièrement importants des animaux obèses, qui présentaient d'ailleurs une augmentation significative du poids du cœur, peut-être liée à une hypertrophie. Par contre, ces animaux n'ont pas développé d'hyperglycémie comme le montre l'absence d'augmentation de la glycémie plasmatique. En effet, malgré certaines études qui notent une augmentation de la glycémie (Li 2004, Toblli 2005), ce modèle animal Zucker obèse est un modèle d'insulino-résistance et n'est pas censé développer d'hyperglycémie avant un âge très avancé, c'est-à-dire suite à une décompensation de l'hyperinsulinémie. Ce phénomène a été clairement démontré dans une publication comparant des rats Zucker Lean, des rats Zucker Fatty et enfin des rats Zucker Diabetic Fatty. Nourris avec un régime spécifique, ces derniers sont

diabétiques et développent rapidement une hyperglycémie, alors que la glycémie des Zucker Fatty n'est pas différente de celle des contrôles Zucker Lean jusqu'à un âge d'au moins 40 semaines où elle augmente sensiblement (Oltman 2006, Pagano 2008). L'analyse de la structure du myocarde par échocardiographie en mode TM n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes d'animaux, mais une tendance à l'augmentation des dimensions pariétales et cavitaires chez les animaux résistants à l'insuline. Cette observation se retrouve dans une augmentation significative de la masse et du volume du ventricule gauche, reflétant une hypertrophie probable avec une dilatation du myocarde. Les mesures effectuées en mode Doppler ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes. Cependant, dans la mesure de la fonction diastolique de remplissage, le rapport des ondes E/A tend à diminuer, ce qui pourrait être lié à la mise en place d'un trouble de la relaxation. Il n'a pas non plus été observé de changement de la performance systolique par les mesures en doppler mitral. Il faut toutefois noter que les SEM sont importantes et traduisent une grande variabilité dans les mesures, notamment en mode doppler, qui pourrait être due à la courbe d'apprentissage, ou à l'obésité des animaux qui peut interférer avec la qualité des images. Par ailleurs, le faible effectif peut aussi expliquer l'absence de différences significatives. Très peu de données sont disponibles sur l'échocardiographie chez le rat Zucker Fatty, peut être à cause de la faible échogénicité liée à son obésité. Une étude a pourtant noté une augmentation des dimensions pariétales et cavitaires, avec cependant une diminution de la fraction de raccourcissement (Toblli 2003). Malgré l'absence d'augmentation de la fibrose, une diminution significative de 23% de la densité capillaire a été observée chez les rats Zucker obèses. La diminution de la densité capillaire a été plusieurs fois observée, comme pour He et coll. avec une diminution de 30% chez des Zucker obèses de 14 à 22 semaines (He 2006, Toblli 2003). Les résultats concernant la fibrose semblent plus controversés. Pagano et coll. n'ont pas noté d'augmentation de la fibrose à un âge de 21 à 23 semaines (Pagano 2008), alors que la fibrose interstitielle était 2.5 fois plus élevée entre 14 et 16 semaines dans une étude de Li et coll. (Li 2004). Finalement, malgré la mise en évidence d'altérations de la structure du myocarde, et probablement de la fonction, l'hétérogénéité de la perfusion in vivo évaluée par SPECT au  $^{201}\text{Tl}$  et au  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$  n'a pas montré de différence entre les rats Zucker Fatty et leurs contrôles dans notre étude. L'unique différence observée est une augmentation paradoxale de l'homogénéité de la perfusion chez les rats résistants à l'insuline lorsque les images sont exagérément filtrées. Cependant, suite à l'observation des coupes marquées histologiquement, nous pouvons noter que la diminution de la densité capillaire

semble être homogène, ce qui pourrait limiter l'augmentation de l'hétérogénéité de la perfusion observée en imagerie SPECT chez les animaux résistants à l'insuline.

### **2.2.6 Limites de la méthode**

Nous pouvions nous attendre à être limités par l'utilisation du  $^{201}\text{Tl}$  comme nous l'avons démontré précédemment dans l'étude méthodologique 2.1.2, mais les résultats obtenus avec le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI sont similaires. Les moyennes des index H sont particulièrement basses, même pour les animaux témoins, ce qui traduit une forte hétérogénéité. D'après cette même étude méthodologique 2.1.2, nous avons vu qu'une augmentation de l'activité augmente l'homogénéité mesurée, ce qui pourrait alors indiquer que les activités cardiaques obtenues lors de cette dernière étude physiopathologique ne sont pas suffisantes pour une analyse correcte. Cependant, les doses injectées sont déjà très élevées, et il ne semble pas raisonnable, voire même méthodologiquement très difficile, d'injecter des doses plus importantes chez des petits rongeurs.

De plus, l'étude clinique 1.1 nous avait appris l'importance du traitement de l'image, et plus particulièrement du filtrage de l'image, dont une augmentation permettait d'obtenir des images plus homogènes. Malgré un filtrage des images physiopathologiques au maximum, aucune moyenne ne dépasse 0.41, ce qui reflète des images très hétérogènes. Il n'y a que peu de paramètres de reconstruction auxquels nous ayons accès, et il se peut que nous soyons limités sur le traitement des images. Il faudrait approfondir ce dernier point en faisant éventuellement varier les filtres ou les résolutions, mais la technologie actuellement disponible n'est pas suffisante.

### **2.2.7 Conclusion et perspectives**

Le modèle de diabète de type 1 utilisé ne semblait pas être correct pour l'étude de l'hétérogénéité de la perfusion, par son absence d'altération dans la structure ou la fonction du myocarde, et n'a d'ailleurs pas montré de différence entre les index H des animaux diabétiques et des animaux normaux. Cependant, le modèle d'insulino-résistance ayant



montré des différences dans les paramètres cardiaques, n'a pas non plus réussi à mettre en évidence de différence dans les index d'hétérogénéité mesurés, ce qui nous pousse à penser à une limitation au niveau du traitement de l'image.

## **Conclusion générale**

L'étude clinique a démontré la capacité du  $^{201}\text{Tl}$  en imagerie SPECT de routine à quantifier l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde chez des patients diabétiques par rapport à des patients normaux. Cependant, concernant l'application de cette analyse dans des études physiopathologiques chez le petit animal, la technologie actuellement disponible ne semble pas satisfaisante pour obtenir des résultats similaires à l'étude clinique.

## Références bibliographiques

- Abe A**, Karaki H. Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyl cyclic AMP in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* **1992** Feb 18;211(3):305-11.
- Abraham D**. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? *Rheumatology (Oxford).* **2008** Oct;47 Suppl 5:v8-9. Review.
- Adachi T**, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* **2004** Nov;10(11):1200-7.
- Addabbo F**, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension.* **2009** Jun;53(6):885-92. Review.
- Alderton WK**, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **2001** Aug 1;357(Pt 3):593-615. Review.
- Anderson TJ**, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* **1995a** Feb 23;332(8):488-93.
- Anderson TJ**, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* **1995b** Nov 1;26(5):1235-41.
- Andries LJ**, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res.* **1998** Feb 9;82(2):195-203.
- Aneja A**, Tang WH, Bansilal S, Garcia MJ, Farkouh ME. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am J Med.* **2008** Sep;121(9):748-57. Review.
- Ardigo D**, Franzini L, Valtuena S, Monti LD, Reaven GM, Zavaroni I. Relation of plasma insulin levels to forearm flow-mediated dilatation in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* **2006** Apr 15;97(8):1250-4.
- Ayajiki K**, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* **1996** May;78(5):750-8.
- 
- Baggish AL**, Boucher CA. Radiopharmaceutical agents for myocardial perfusion imaging. *Circulation.* **2008** Oct 14;118(16):1668-74. Review.
- Balletshofer BM**, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Häring HU. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation.* **2000** Apr 18;101(15):1780-4.
- Bassingthwaighte JB**, King RB, Roger SA. Fractal nature of regional myocardial blood flow heterogeneity. *Circ Res.* **1989** Sep;65(3):578-90.
- Bassingthwaighte JB**, Leibovitch LS, West BJ. *Fractal Physiology.* Oxford University Press, New York. **1994**.
- Bassingthwaighte JB**, Li Z. Heterogeneities in myocardial flow and metabolism: exacerbation with abnormal excitation. *Am J Cardiol.* **1999** Jun 17;83(12A):7H-12H. Review.
- Beanlands RS**, Dawood F, Wen WH, McLaughlin PR, Butany J, D'Amati G, Liu PP. Are the kinetics of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile affected by cell metabolism and viability? *Circulation.* **1990** Nov;82(5):1802-14.
- Beard DA**, Bassingthwaighte JB. The fractal nature of myocardial blood flow emerges from a whole-organ model of arterial network. *J Vasc Res.* **2000** Jul-Aug;37(4):282-96.
- Beckman JA**, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of protein kinase C $\beta$  prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res.* **2002** Jan 11;90(1):107-11.

- Bedard K**, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **2007** Jan;87(1):245-313. Review.
- Beller GA**, Glover DK, Edwards NC, Ruiz M, Simanis JP, Watson DD. 99mTc-sestamibi uptake and retention during myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* **1993** Jun;87(6):2033-42.
- Beller GA**, Bergmann SR. Myocardial perfusion imaging agents: SPECT and PET. *J Nucl Cardiol.* **2004** Jan-Feb;11(1):71-86. Review.
- Benjamin EJ**, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasani RS, Keaney JF Jr, Lehman BT, Fan S, O'Seaghdha E, Vita JA. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation.* **2004** Feb 10;109(5):613-9.
- Bergholm R**, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Tamminen M, Teramo K, Rissanen A, Yki-Järvinen H. Lowering of LDL cholesterol rather than moderate weight loss improves endothelium-dependent vasodilatation in obese women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care.* **2003** Jun;26(6):1667-72.
- Bhatia VK**, Senior R. Contrast echocardiography: evidence for clinical use. *J Am Soc Echocardiogr.* **2008** May;21(5):409-16. Review.
- Bisoendial RJ**, Hovingh GK, Levels JH, Lerch PG, Andresen I, Hayden MR, Kastelein JJ, Stroes ES. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation.* **2003** Jun 17;107(23):2944-8.
- Boden G**, Chen X, Rosner J, Barton M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes.* **1995** Oct;44(10):1239-42.
- Bodi V**, Sanchis J, Lopez-Lereu MP, Nunez J, Mainar L, Monmeneu JV, Husser O, Dominguez E, Chorro FJ, Llacer A. Prognostic value of dipyridamole stress cardiovascular magnetic resonance imaging in patients with known or suspected coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **2007** Sep 18;50(12):1174-9.
- Bolotina VM**, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* **1994** Apr 28;368(6474):850-3.
- Bossaller C**, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest.* **1987** Jan;79(1):170-4.
- Boudina S**, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation.* **2007** Jun 26;115(25):3213-23. Review.
- Boulanger C**, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest.* **1990** Feb;85(2):587-90.
- Brown KA**. Prognostic value of thallium-201 myocardial perfusion imaging. A diagnostic tool comes of age. *Circulation.* **1991** Feb;83(2):363-81. Review.
- Brook RD**, Bard RL, Rubenfire M, Ridker PM, Rajagopalan S. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults. *Am J Cardiol.* **2001** Dec 1;88(11):1264-9.
- Brown KA**. Prognostic value of myocardial perfusion imaging: state of the art and new developments. *J Nucl Cardiol.* **1996** Nov-Dec;3(6 Pt 1):516-37. Review.
- Brownlee M**. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **2001** Dec 13;414(6865):813-20.
- Brunner H**, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancina G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* **2005** Feb;23(2):233-46. Review.
- Brunner F**, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* **2006** Aug;111(2):508-31. Review.
- Bugiardini R**, Manfrini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of women with chest pain and normal coronary angiograms. *Circulation.* **2004** Jun 1;109(21):2518-23.
- Bukoski RD**, Bergmann C, Gairard A, Stoclet JC. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and force determined simultaneously in isolated resistance arteries. *Am J Physiol.* **1989** Nov;257(5 Pt 2):H1728-35.

**Bunting S**, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. **1976** Dec;12(6):897-913.

---

**Caballero AE**, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. **1999** Sep;48(9):1856-62.

**Caballero AE**, Saouaf R, Lim SC, Hamdy O, Abou-Elenin K, O'Connor C, Legerfo FW, Horton ES, Veves A. The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism*. **2003** Feb;52(2):173-80.

**Caballero AE**. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: a focus on subjects at risk for type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. **2004** Aug;4(4):237-46. Review.

**Calles-Escandon J**, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*. **2001** Feb;22(1):36-52. Review.

**Campia U**, Sullivan G, Bryant MB, Waclawiw MA, Quon MJ, Panza JA. Insulin impairs endothelium-dependent vasodilation independent of insulin sensitivity or lipid profile. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2004** Jan;286(1):H76-82.

**Capaldo B**, Napoli R, Di Marino L, Picardi A, Riccardi G, Sacca L. Quantitation of forearm glucose and free fatty acid (FFA) disposal in normal subjects and type II diabetic patients: evidence against an essential role for FFA in the pathogenesis of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. **1988** Nov;67(5):893-8.

**Cardillo C**, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation*. **2002** Jan 29;105(4):452-6.

**Cardillo C**, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO 3rd, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension*. **1999** Feb;33(2):753-8.

**Casino PR**, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation*. **1993** Dec;88(6):2541-7.

**Celermajer DS**, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. **1992** Nov 7;340(8828):1111-5.

**Celermajer DS**, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. **1993** Nov;88(5 Pt 1):2149-55.

**Celermajer DS**, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med*. **1996** Jan 18;334(3):150-4.

**Cersosimo E**, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev*. **2006** Nov-Dec;22(6):423-36. Review.

**Chiarugi P**, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Symons M, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol*. **2003** Jun 9;161(5):933-44.

**Chowienzyk PJ**, Watts GF, Wierzbicki AS, Cockcroft JR, Brett SE, Ritter JM. Preserved endothelial function in patients with severe hypertriglyceridemia and low functional lipoprotein lipase activity. *J Am Coll Cardiol*. **1997** Apr;29(5):964-8.

**Coleman RA**, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*. **1994** Jun;46(2):205-29. Review.

**Corretti MC**, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. **2002** Jan 16;39(2):257-65.

- Cox DA**, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation*. **1989** Sep;80(3):458-65.
- Craven PA**, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem*. **1978** Dec 10;253(23):8433-43.
- Czernin J**, Barnard RJ, Sun KT, Krivokapich J, Nitzsche E, Dorsey D, Phelps ME, Schelbert HR. Effect of short-term cardiovascular conditioning and low-fat diet on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation*. **1995** Jul 15;92(2):197-204.
- 
- Dandona P**, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P. Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. **2004** Aug;5(3):189-97. Review.
- Dandona P**, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. **2004** Jan;25(1):4-7. Review.
- Dayanikli F**, Grambow D, Muzik O, Mosca L, Rubenfire M, Schwaiger M. Early detection of abnormal coronary flow reserve in asymptomatic men at high risk for coronary artery disease using positron emission tomography. *Circulation*. **1994** Aug;90(2):808-17.
- Dayton PA**, Morgan KE, Klivanov AL, Brandenburger GH, Ferrara KW. Optical and acoustical observations of the effects of ultrasound on contrast agents. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. **1999**;46(1):220-32.
- de Jongh S**, Lilien MR, Bakker HD, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. **2002** Jul;163(1):193-7.
- de Jongh RT**, Serné EH, IJzerman RG, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation*. **2004** Jun 1;109(21):2529-35.
- de Man FH**, Weverling-Rijnsburger AW, van der Laarse A, Smelt AH, Jukema JW, Blauw GJ. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2000** Mar;20(3):744-50.
- De Mey JG**, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res*. **1982** Oct;51(4):439-47.
- Deanfield JE**, Selwyn AP. Character and causes of transient myocardial ischemia during daily life. Implications for treatment of patients with coronary disease. *Am J Med*. **1986** Apr 30;80(4C):18-24.
- Deanfield JE**, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. **2007** Mar 13;115(10):1285-95. Review.
- Decking UK**, Schrader J. Spatial heterogeneity of myocardial perfusion and metabolism. *Basic Res Cardiol*. **1998** Dec;93(6):439-45. Review.
- Decking UK**, Skwirba S, Zimmerman MF, Preckel B, Loncar R, Thamer V, Deussen A, Schrader J. Does local coronary flow control metabolic flux rates? A <sup>13</sup>C-NMR study. *MAGMA*. **1998** Sep;6(2-3):133-4.
- Delpy E**, Coste H, Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol*. **1996** Oct;119(3):471-8.
- DeSouza CA**, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*. **2000** Sep 19;102(12):1351-7.
- Deussen A**, Flesche CW, Lauer T, Sonntag M, Schrader J. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pflugers Arch*. **1996** Jul;432(3):451-61.
- Deussen A**. Blood flow heterogeneity in the heart. *Basic Res Cardiol*. **1998** Dec;93(6):430-8. Review.
- Di Bella EV**, Parker DL, Sinusas AJ. On the dark rim artifact in dynamic contrast-enhanced MRI myocardial perfusion studies. *Magn Reson Med*. **2005** Nov;54(5):1295-9.
- Di Carli MF**, Hachamovitch R. Should PET replace SPECT for evaluating CAD? The end of the beginning. *J Nucl Cardiol*. **2006** Jan-Feb;13(1):2-7.

**Diederich D**, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol.* **1994** Mar;266(3 Pt 2):H1153-61.

**Dijkmans PA**, Senior R, Becher H, Porter TR, Wei K, Visser CA, Kamp O. Myocardial contrast echocardiography evolving as a clinically feasible technique for accurate, rapid, and safe assessment of myocardial perfusion: the evidence so far. *J Am Coll Cardiol.* **2006** Dec 5;48(11):2168-77. Review.

**Dilsizian V**, Rocco TP, Freedman NM, Leon MB, Bonow RO. Enhanced detection of ischemic but viable myocardium by the reinjection of thallium after stress-redistribution imaging. *N Engl J Med.* **1990** Jul 19;323(3):141-6.

**Dimmeler S**, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* **1999** Jun 10;399(6736):601-5.

**Drexler H**, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension.* **1991** Oct;18(4 Suppl):II90-9.

**Dröge W**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **2002** Jan;82(1):47-95. Review.

**Du XL**, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* **2001** Nov;108(9):1341-8.

---

**Edwards G**, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor--a critical appraisal. *Prog Drug Res.* **1998**;50:107-33. Review.

**Edwards G**, Féléto M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.* **2010** May;459(6):863-79. Review.

**el-Mesallamy H**, Suwailem S, Hamdy N. Evaluation of C-reactive protein, endothelin-1, adhesion molecule(s), and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients. *Mediators Inflamm.* **2007**;2007:73635.

**el-Tamimi H**, Mansour M, Wargovich TJ, Hill JA, Kerensky RA, Conti CR, Pepine CJ. Constrictor and dilator responses to intracoronary acetylcholine in adjacent segments of the same coronary artery in patients with coronary artery disease. Endothelial function revisited. *Circulation.* **1994** Jan;89(1):45-51.

**Evans JL**, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* **2002** Oct;23(5):599-622. Review.

---

**Falk E**, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* **1995** Aug 1;92(3):657-71. Review.

**Federici M**, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation.* **2002** Jul 23;106(4):466-72.

**Féléto M**, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2006** Sep;291(3):H985-1002. Review.

**Féléto M**, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* **2009** Jul 16;117(4):139-55. Review.

**Feron O**, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem.* **1998** Feb 6;273(6):3125-8.

**Fleming I**, Busse R. Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol.* **1995**;34:187-206. Review.

**Fleming I**, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* **1999** Aug 15;43(3):532-41. Review.

**Fleming I**, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* **2001** Jun 8;88(11):E68-75.

**Fleming I**, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2003** Jan;284(1):R1-12. Review.

- Fleming I.** Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* **2010** May;459(6):793-806. Review.
- Förstermann U,** Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* **1994** Jun;23(6 Pt 2):1121-31. Review.
- Fritz-Hansen T,** Hove JD, Kofoed KF, Kelbaek H, Larsson HB. Quantification of MRI measured myocardial perfusion reserve in healthy humans: a comparison with positron emission tomography. *J Magn Reson Imaging.* **2008** Apr;27(4):818-24.
- Fukuyama T,** Nakamura M, Nakagaki O, Matsuguchi H, Mitsutake A, Kikuchi Y, Kuroiwa A. Reduced reflow and diminished uptake of <sup>86</sup>Rb after temporary coronary occlusion. *Am J Physiol.* **1978** Jun;234(6):H724-9.
- Furchgott RF,** Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **1980** Nov 27;288(5789):373-6.
- 
- Galassi AR,** Crea F, Araujo LI, Lammertsma AA, Pupita G, Yamamoto Y, Rechavia E, Jones T, Kaski JC, Maseri A. Comparison of regional myocardial blood flow in syndrome X and one-vessel coronary artery disease. *Am J Cardiol.* **1993** Jul 15;72(2):134-9.
- Gao Y.** The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* **2010** May;459(6):829-39. Review.
- Gill JB,** Ruddy TD, Newell JB, Finkelstein DM, Strauss HW, Boucher CA. Prognostic importance of thallium uptake by the lungs during exercise in coronary artery disease. *N Engl J Med.* **1987** Dec 10;317(24):1486-9.
- Gioia G,** Milan E, Giubbini R, DePace N, Heo J, Iskandrian AS. Prognostic value of tomographic rest-redistribution thallium 201 imaging in medically treated patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction. *J Nucl Cardiol.* **1996** Mar-Apr;3(2):150-6.
- Glover DK,** Okada RD. Myocardial kinetics of Tc-MIBI in canine myocardium after dipyridamole. *Circulation.* **1990** Feb;81(2):628-37.
- Glover DK,** Ruiz M, Edwards NC, Cunningham M, Simanis JP, Smith WH, Watson DD, Beller GA. Comparison between <sup>201</sup>Tl and <sup>99m</sup>Tc sestamibi uptake during adenosine-induced vasodilation as a function of coronary stenosis severity. *Circulation.* **1995** Feb 1;91(3):813-20.
- Gluais P,** Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* **2005** Nov;146(6):834-45.
- Go RT,** Marwick TH, MacIntyre WJ, Saha GB, Neumann DR, Underwood DA, Simpfendorfer CC. A prospective comparison of rubidium-82 PET and thallium-201 SPECT myocardial perfusion imaging utilizing a single dipyridamole stress in the diagnosis of coronary artery disease. *J Nucl Med.* **1990** Dec;31(12):1899-905.
- Goligorsky MS,** Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E. Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **1999** Mar;26(3):269-71. Review.
- Gokce N,** Vita JA, McDonnell M, Forse AR, Istfan N, Stoeckl M, Lipinska I, Keaney JF Jr, Apovian CM. Effect of medical and surgical weight loss on endothelial vasomotor function in obese patients. *Am J Cardiol.* **2005** Jan 15;95(2):266-8.
- Goldstein BJ,** Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* **2005** Jul-Aug;7(7-8):1021-31. Review.
- 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** Oct;24(10):907-15.
- González-Fernández F,** Jiménez A, López-Blaya A, Velasco S, Arriero MM, Celdrán A, Rico L, Farré J, Casado S, López-Farré A. Cerivastatin prevents tumor necrosis factor-alpha-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase: role of endothelial cytosolic proteins. *Atherosclerosis.* **2001** Mar;155(1):61-70.
- Goodhart DM,** Anderson TJ. Role of nitric oxide in coronary arterial vasomotion and the influence of coronary atherosclerosis and its risks. *Am J Cardiol.* **1998** Nov 1;82(9):1034-9.



- Goto K**, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol*. **1996** Dec;72(4):261-90. Review.
- Gould KL**, Kelley KO, Bolson EL. Experimental validation of quantitative coronary arteriography for determining pressure-flow characteristics of coronary stenosis. *Circulation*. **1982** Nov;66(5):930-7.
- 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 vasodilation. VIII. Clinical feasibility of positron cardiac imaging without a cyclotron using generator-produced rubidium-82. *J Am Coll Cardiol*. **1986** Apr;7(4):775-89.
- Gould KL**, Martucci JP, Goldberg DI, Hess MJ, Edens RP, Latifi R, Dudrick SJ. Short-term cholesterol lowering decreases size and severity of perfusion abnormalities by positron emission tomography after dipyridamole in patients with coronary artery disease. A potential noninvasive marker of healing coronary endothelium. *Circulation*. **1994** Apr;89(4):1530-8.
- Gould KL**. Coronary Artery Stenosis and Reversing Atherosclerosis. 2nd ed. London, U.K.: Arnold Publishers. **1999**:289–327.
- Gould KL**, Nakagawa Y, Nakagawa K, Sdringola S, Hess MJ, Haynie M, Parker N, Mullani N, Kirkeeide R. Frequency and clinical implications of fluid dynamically significant diffuse coronary artery disease manifest as graded, longitudinal, base-to-apex myocardial perfusion abnormalities by noninvasive positron emission tomography. *Circulation*. **2000** Apr 25;101(16):1931-9.
- Gould KL**. Assessing progression or regression of CAD: the role of perfusion imaging. *J Nucl Cardiol*. **2005** Nov-Dec;12(6):625-38.
- Gratton JP**, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem*. **2000** Jul 21;275(29):22268-72.
- Grisham MB**. Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med*. **2004** Jun 15;36(12):1479-80. Review.
- Groeneveld AB**, Visser FC. Correlation of heterogeneous blood flow and fatty acid uptake in the normal dog heart. *Basic Res Cardiol*. **1993** May-Jun;88(3):223-32.
- Grover-Páez F**, Zavalza-Gómez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*. **2009** Apr;84(1):1-10. Review.
- Gudmundsson GS**, Sinkey CA, Chenard CA, Stumbo PJ, Haynes WG. Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol*. **2000** Feb 1;85(3):381-5.
- Giugliano D**, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. **1996** Mar;19(3):257-67. Review.
- Gutterman DD**, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2005** Apr;25(4):671-8. Review.
- 
- Hachamovitch R**, Berman DS, Shaw LJ, Kiat H, Cohen I, Cabico JA, Friedman J, Diamond GA. Incremental prognostic value of myocardial perfusion single photon emission computed tomography for the prediction of cardiac death: differential stratification for risk of cardiac death and myocardial infarction. *Circulation*. **1998** Feb 17;97(6):535-43.
- Halcox JP**, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. **2002** Aug 6;106(6):653-8.
- Halushka PV**, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **1989**;29:213-39. Review.
- Hamburg NM**, Larson MG, Vita JA, Vasan RS, Keyes MJ, Widlansky ME, Fox CS, Mitchell GF, Levy D, Meigs JB, Benjamin EJ. Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in Framingham Offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. **2008** Jan 1;101(1):82-8.
- Hamdy O**, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, O'valle K, Moussa A, Caselli A, Caballero AE, Economides PA, Veves A, Horton ES. Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*. **2003** Jul;26(7):2119-25.

- Harrison HE**, Reece AH, Johnson M. Effect of insulin treatment on prostacyclin in experimental diabetes. *Diabetologia*. **1980** Jan;18(1):65-8.
- Hartell NA**, Archer HE, Bailey CJ. Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol*. **2005** Mar 1;69(5):781-90.
- He Z**, Opland DM, Way KJ, Ueki K, Bodyak N, Kang PM, Izumo S, Kulkarni RN, Wang B, Liao R, Kahn CR, King GL. Regulation of vascular endothelial growth factor expression and vascularization in the myocardium by insulin receptor and PI3K/Akt pathways in insulin resistance and ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006** Apr;26(4):787-93.
- Hecker M**, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem*. **1989** Jan 5;264(1):141-50.
- Hendel RC**, Patel MR, Kramer CM, Poon M, Hendel RC, Carr JC, Gerstad NA, Gillam LD, Hodgson JM, Kim RJ, Kramer CM, Lesser JR, Martin ET, Messer JV, Redberg RF, Rubin GD, Rumsfeld JS, Taylor AJ, Weigold WG, Woodard PK, Brindis RG, Hendel RC, Douglas PS, Peterson ED, Wolk MJ, Allen JM, Patel MR; American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group; American College of Radiology; Society of Cardiovascular Computed Tomography; Society for Cardiovascular Magnetic Resonance; American Society of Nuclear Cardiology; North American Society for Cardiac Imaging; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology. ACCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR 2006 appropriateness criteria for cardiac computed tomography and cardiac magnetic resonance imaging: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American College of Radiology, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, American Society of Nuclear Cardiology, North American Society for Cardiac Imaging, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Interventional Radiology. *J Am Coll Cardiol*. **2006** Oct 3;48(7):1475-97. Review.
- Hendrickx H**, Casteels R. Electrogenic sodium pump in arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. **1974**;346(4):299-306.
- Higashi Y**, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. **2001** Oct;14(10):1038-45.
- Higashi Y**, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens*. **2002** Apr;15(4 Pt 1):326-32.
- Hofmann F**, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*. **2009**;(191):137-62. Review.
- Hotamisligil GS**, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. **1993** Jan 1;259(5091):87-91.
- 
- Iellamo F**, Tesauro M, Rizza S, Aquilani S, Cardillo C, Iantorno M, Turriziani M, Lauro R. Concomitant impairment in endothelial function and neural cardiovascular regulation in offspring of type 2 diabetic subjects. *Hypertension*. **2006** Sep;48(3):418-23.
- Ignarro LJ**. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol*. **1989** Jan;26(1):63-76. Review.
- Inghanisorn WP**, Kwong RY, Bohme NS, Geller NL, Rhoads KL, Dyke CK, Paterson DI, Syed MA, Aletras AH, Arai AE. Prognosis of negative adenosine stress magnetic resonance in patients presenting to an emergency department with chest pain. *J Am Coll Cardiol*. **2006** Apr 4;47(7):1427-32.
- Inoguchi T**, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. **2000** Nov;49(11):1939-45.
- Iskandrian AS**, Chae SC, Heo J, Stanberry CD, Wasserleben V, Cave V. Independent and incremental prognostic value of exercise single-photon emission computed tomographic (SPECT) thallium imaging in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. **1993** Sep;22(3):665-70.

**Ito M**, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* **2004** Apr;259(1-2):197-209. Review.

---

**Jackson TS**, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res.* **1998** Nov 2;83(9):916-22.

**Jayaweera AR**, Edwards N, Glasheen WP, Villanueva FS, Abbott RD, Kaul S. In vivo myocardial kinetics of air-filled albumin microbubbles during myocardial contrast echocardiography. Comparison with radiolabeled red blood cells. *Circ Res.* **1994** Jun;74(6):1157-65.

**Jerosch-Herold M**, Wilke N, Wang Y, Gong GR, Mansoor AM, Huang H, Gurchumelidze S, Stillman AE. Direct comparison of an intravascular and an extracellular contrast agent for quantification of myocardial perfusion. *Cardiac MRI Group. Int J Card Imaging.* **1999** Dec;15(6):453-64.

**Jesmin S**, Zaedi S, Shimojo N, Iemitsu M, Masuzawa K, Yamaguchi N, Mowa CN, Maeda S, Hattori Y, Miyauchi T. Endothelin antagonism normalizes VEGF signalling and cardiac function in STZ-induced diabetic rat hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2007** Apr;292(4):E1030-40.

**Jin ZG**, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* **2003** Aug 22;93(4):354-63.

**Joannides R**, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* **1995** Mar 1;91(5):1314-9.

**Joannides R**, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol.* **2006** Jun;20(3):311-20. Review.

**Johnson LL**, Verdesca SA, Aude WY, Xavier RC, Nott LT, Campanella MW, Germano G. Postischemic stunning can affect left ventricular ejection fraction and regional wall motion on post-stress gated sestamibi tomograms. *J Am Coll Cardiol.* **1997** Dec;30(7):1641-8.

**Johnson M**, Harrison HE, Raftery AT, Elder JB. Vascular prostacyclin may be reduced in diabetes in man. *Lancet.* **1979** Feb 10;1(8111):325-6.

**Johnson NP**, Gould KL. Clinical evaluation of a new concept: resting myocardial perfusion heterogeneity quantified by markovian analysis of PET identifies coronary microvascular dysfunction and early atherosclerosis in 1,034 subjects. *J Nucl Med.* **2005** Sep;46(9):1427-37.

**Johnstone MT**, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* **1993** Dec;88(6):2510-6.

**Jonkers IJ**, van de Ree MA, Smelt AH, de Man FH, Jansen H, Meinders AE, van der Laarse A, Blauw GJ. Insulin resistance but not hypertriglyceridemia per se is associated with endothelial dysfunction in chronic hypertriglyceridemia. *Cardiovasc Res.* **2002** Feb 1;53(2):496-501.

---

**Kailasnath P**, Sinusas AJ. Technetium-99m-labeled myocardial perfusion agents: Are they better than thallium-201? *Cardiol Rev.* **2001** May-Jun;9(3):160-72. Review.

**Katakam PV**, Tulbert CD, Snipes JA, Erdös B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005** Feb;288(2):H854-60.

**Kaufmann PA**, Gnechi-Ruscione T, di Terlizzi M, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Coronary heart disease in smokers: vitamin C restores coronary microcirculatory function. *Circulation.* **2000** Sep 12;102(11):1233-8.

**Kaufmann PA**, Gnechi-Ruscione T, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Low density lipoprotein cholesterol and coronary microvascular dysfunction in hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* **2000b** Jul;36(1):103-9.

**Kaul S**, Senior R, Dittrich H, Raval U, Khattar R, Lahiri A. Detection of coronary artery disease with myocardial contrast echocardiography: comparison with 99mTc-sestamibi single-photon emission computed tomography. *Circulation.* **1997** Aug 5;96(3):785-92.

- Keaney JF Jr**, Massaro JM, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring Study. *J Am Coll Cardiol.* **2004** Jul 7;44(1):168-73.
- Kedzierski RM**, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2001**;41:851-76. Review.
- Kellman P**, Arai AE. Imaging sequences for first pass perfusion --a review. *J Cardiovasc Magn Reson.* **2007**;9(3):525-37.
- Khavandi K**, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2009** Jun;23(3):347-60. Review.
- Kim JA**, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* **2006** Apr 18;113(15):1888-904. Review.
- King RB**, Bassingthwaite JB, Hales JR, Rowell LB. Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons. *Circ Res.* **1985** Aug;57(2):285-95.
- King RB**, Bassingthwaite JB. Temporal fluctuations in regional myocardial flows. *Pflugers Arch.* **1989** Feb;413(4):336-42.
- Kinsella BT**. Thromboxane A2 signalling in humans: a 'Tail' of two receptors. *Biochem Soc Trans.* **2001** Nov;29(Pt 6):641-54.
- Kleen M**, Welte M, Lacknermeier P, Habler O, Kemming G, Messmer K. Myocardial blood flow heterogeneity in shock and small-volume resuscitation in pigs with coronary stenosis. *J Appl Physiol.* **1997** Dec;83(6):1832-41.
- Klem I**, Heitner JF, Shah DJ, Sketch MH Jr, Behar V, Weinsaft J, Cawley P, Parker M, Elliott M, Judd RM, Kim RJ. Improved detection of coronary artery disease by stress perfusion cardiovascular magnetic resonance with the use of delayed enhancement infarction imaging. *J Am Coll Cardiol.* **2006** Apr 18;47(8):1630-8.
- Korkmaz H**, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium.* **2008** Jul-Aug;15(4):157-63. Review.
- Krum H**, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med.* **1998** Mar 19;338(12):784-90.
- Kukovetz WR**, Holzmann S, Wurm A, Pösch G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J Cyclic Nucleotide Res.* **1979** Dec;5(6):469-76.
- Kuo L**, Davis MJ, Chilian WM. Longitudinal gradients for endothelium-dependent and -independent vascular responses in the coronary microcirculation. *Circulation.* **1995** Aug 1;92(3):518-25.
- Kuvin JT**, Rämetsä ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J.* **2002** Jul;144(1):165-72.
- 
- Ladenheim ML**, Pollock BH, Rozanski A, Berman DS, Staniloff HM, Forrester JS, Diamond GA. Extent and severity of myocardial hypoperfusion as predictors of prognosis in patients with suspected coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **1986** Mar;7(3):464-71.
- Laine H**, Yki-Jarvinen H, Kirvela O, Tolvanen T, Raitakari M, Solin O, Haaparanta M, Knuuti J, Nuutila P. Insulin resistance of glucose uptake in skeletal muscle cannot be ameliorated by enhancing endothelium-dependent blood flow in obesity. *J Clin Invest.* **1998** Mar 1;101(5):1156-62.
- Lampinen KH**, Rönnback M, Groop PH, Kaaja RJ. A relationship between insulin sensitivity and vasodilation in women with a history of preeclamptic pregnancy. *Hypertension.* **2008** Aug;52(2):394-401.
- Lassègue B**, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens.* **2004** Sep;17(9):852-60. Review.
- Li Y**, Peng G, Li Q, Wen S, Huang TH, Roufogalis BD, Yamahara J. *Salacia oblonga* improves cardiac fibrosis and inhibits postprandial hyperglycemia in obese Zucker rats. *Life Sci.* **2004** Aug 20;75(14):1735-46.
- Libby P**. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* **2001** Jul 17;104(3):365-72. Review.

- Lin JW**, Sciacca RR, Chou RL, Laine AF, Bergmann SR. Quantification of myocardial perfusion in human subjects using  $^{82}\text{Rb}$  and wavelet-based noise reduction. *J Nucl Med*. **2001** Feb;42(2):201-8.
- Lipiec P**, Wejner-Mik P, Krzemińska-Pakuła M, Kuśmierk J, Płachcińska A, Szumiński R, Peruga JZ, Kasprzak JD. Accelerated stress real-time myocardial contrast echocardiography for the detection of coronary artery disease: comparison with  $^{99\text{mTc}}$  single photon emission computed tomography. *J Am Soc Echocardiogr*. **2008** Aug;21(8):941-7.
- Lopes R**, Dubois P, Bhourri I, Akkari-Bettaieb H, Maouche S, Betrouni N. La géométrie fractale pour l'analyse de signaux médicaux: état de l'art. *IRBM*. **2010** sep;31(4):189-208.
- Loscalzo J**, Vita JA. Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations. *Circulation*. **1994** Nov;90(5):2556-9.
- Lteif AA**, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation*. **2005** Jul 5;112(1):32-8.
- Ludmer PL**, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. **1986** Oct 23;315(17):1046-51.
- Lundman P**, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*. **2001** Jul;38(1):111-6.
- Lupattelli G**, Marchesi S, Roscini AR, Siepi D, Gemelli F, Pirro M, Sinzinger H, Schillaci G, Mannarino E. Direct association between high-density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipemia. *Am J Cardiol*. **2002** Sep 15;90(6):648-50.
- Lüscher TF**, Vanhoutte PM. *The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function*. Boca Raton, CRC Press. **1990**:1-215.
- Lüscher TF**, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M, Bühler FR. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res*. **1990** Apr;66(4):1088-94.
- 
- 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** Apr;23(5):1096-106.
- Mancini GB**, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Lüscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation*. **1996** Aug 1;94(3):258-65. Erratum in: *Circulation* 1996 Sep 15;94(6):1490.
- Mandelbrot B**. How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension. *Science*. **1967** May 5;156(3775):636-8.
- Mandelbrot B**. *The Fractal Geometry of Nature*. WH Freeman and Co, San Francisco. **1983**.
- Martin JL**, Wilson JR, Ferraro N, Laskey WK, Kleaveland JP, Hirshfeld JW Jr. Acute coronary vasoconstrictive effects of cigarette smoking in coronary heart disease. *Am J Cardiol*. **1984** Jul 1;54(1):56-60.
- Masumoto A**, Hirooka Y, Hironaga K, Eshima K, Setoguchi S, Egashira K, Takeshita A. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin). *Am J Cardiol*. **2001** Dec 1;88(11):1291-4.
- Mather KJ**, Verma S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. **2001** Apr;37(5):1344-50.
- Mather KJ**, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. **2002** Dec;51(12):3517-23.
- McVeigh GE**, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. **1992** Aug;35(8):771-6.

- Meier J**, Kleen M, Messmer K. A computer model of fractal myocardial perfusion heterogeneity to elucidate mechanisms of changes in critical coronary stenosis and hypotension. *Bull Math Biol.* **2004** Sep;66(5):1155-71.
- Meigs JB**, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA.* **2000** Jan 12;283(2):221-8.
- Meigs JB**, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* **2004** Apr 28;291(16):1978-86.
- Meyer B**, Mörtl D, Strecker K, Hülsmann M, Kulemann V, Neunteufl T, Pacher R, Berger R. Flow-mediated vasodilation predicts outcome in patients with chronic heart failure: comparison with B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol.* **2005** Sep 20;46(6):1011-8.
- Michel JB**, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **1997** Oct 10;272(41):25907-12.
- Michel T**, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* **2010** May;459(6):807-16. Review.
- Ming Z**, Parent R, Thorin E, Lavallée M. Endothelin-dependent tone limits acetylcholine-induced dilation of resistance coronary vessels after blockade of NO formation in conscious dogs. *Hypertension.* **1998** Nov;32(5):844-8.
- Miwa S**, Iwamuro Y, Zhang XF, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M, Masaki T. Ca<sup>2+</sup> entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol.* **1999** Aug;80(4):281-8. Review.
- Moens AL**, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest.* **2005** Jun;127(6):2254-63. Review.
- Mohanty P**, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000** Aug;85(8):2970-3.
- Mohanty P**, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* **2002** Apr;75(4):767-72.
- Moncada S**, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc.* **1979** Jan;38(1):66-71. Review.
- Moncada S**, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **1991** Jun;43(2):109-42. Review.
- Montagnani M**, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* **2001** Aug 10;276(32):30392-8.
- Montagnani M**, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem.* **2002** Jan 18;277(3):1794-9.
- Monti LD**, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, Valsecchi G, Lucotti P, Pozza G, Bernardinelli L, Casari G, Piatti P. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* **2003** May;52(5):1270-5.
- Morbidelli L**, Orlando C, Maggi CA, Ledda F, Ziche M. Proliferation and migration of endothelial cells is promoted by endothelins via activation of ETB receptors. *Am J Physiol.* **1995** Aug;269(2 Pt 2):H686-95.
- Morrow JD**, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990** Dec;87(23):9383-7.
- Mount PF**, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* **2007** Feb;42(2):271-9. Review.
- Mullani NA**, Gould KL. First-pass measurements of regional blood flow with external detectors. *J Nucl Med.* **1983** Jul;24(7):577-81.
- Mulvagh SL**, Rakowski H, Vannan MA, Abdelmoneim SS, Becher H, Bierig SM, Burns PN, Castello R, Coon PD, Hagen ME, Jollis JG, Kimball TR, Kitzman DW, Kronzon I, Labovitz AJ, Lang RM, Mathew J, Moir WS, Nagueh SF, Pearlman AS, Perez JE, Porter TR, Rosenbloom J, Strachan GM,

Thanigaraj S, Wei K, Woo A, Yu EH, Zoghbi WA; American Society of Echocardiography. American Society of Echocardiography Consensus Statement on the Clinical Applications of Ultrasonic Contrast Agents in Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* **2008** Nov;21(11):1179-201; quiz 1281.

**Münzel T**, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005** Aug;25(8):1551-7. Review.

**Murad F**, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res.* **1987**;249:65-76. Review.

---

**Nabel EG**, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* **1990a** Aug;16(2):349-56.

**Nabel EG**, Selwyn AP, Ganz P. Paradoxical narrowing of atherosclerotic coronary arteries induced by increases in heart rate. *Circulation.* **1990b** Mar;81(3):850-9.

**Nakahata N**. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* **2008** Apr;118(1):18-35. Review.

**Nakashima M**, Vanhoutte PM. Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol.* **1993** Dec;265(6 Pt 2):H2137-41.

**Nakayama M**, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* **1999** Jun 8;99(22):2864-70.

**Nakov R**, Pfarr E, Eberle S; HEAT Investigators. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens.* **2002** Jul;15(7 Pt 1):583-9.

**Nandalur KR**, Dwamena BA, Choudhri AF, Nandalur MR, Carlos RC. Diagnostic performance of stress cardiac magnetic resonance imaging in the detection of coronary artery disease: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* **2007** Oct 2;50(14):1343-53. Review.

**Nathan DM**, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH, Genuth S; Diabetes Control and Complications Trial; Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* **2003** Jun 5;348(23):2294-303.

**Nelson MT**, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* **1995** Apr;268(4 Pt 1):C799-822. Review.

**Newby AC**, Henderson AH. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol.* **1990**;52:661-74. Review.

**Newby DE**, Wright RA, Labinjoh C, Ludlam CA, Fox KA, Boon NA, Webb DJ. Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation.* **1999** Mar 23;99(11):1411-5.

**Newby DE**, McLeod AL, Uren NG, Flint L, Ludlam CA, Webb DJ, Fox KA, Boon NA. Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation.* **2001** Apr 17;103(15):1936-41.

**Nguyen TD**, Véquaud P, Thorin E. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and alpha-adrenergic-dependent contractions of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc Res.* **1999** Aug 15;43(3):755-61.

**Nicolls MR**, Haskins K, Flores SC. Oxidant stress, immune dysregulation, and vascular function in type I diabetes. *Antioxid Redox Signal.* **2007** Jul;9(7):879-89. Review.

**Nystrom FH**, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal.* **1999** Aug;11(8):563-74. Review.

---

**O'Brien SF**, Watts GF, Playford DA, Burke V, O'Neal DN, Best JD. Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med.* **1997** Nov;14(11):974-8.

**Okumura K**, Yasue H, Matsuyama K, Ogawa H, Morikami Y, Obata K, Sakaino N. Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between the constrictor response of the

infarct-related coronary artery and that of the noninfarct-related artery. *J Am Coll Cardiol.* **1992** Mar 15;19(4):752-8.

**Oltman CL**, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA. Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2006** Oct;291(4):H1780-7.

---

**Pacher P**, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* **2007** Jan;87(1):315-424. Review.

**Pagano C**, Calcagno A, Granzotto M, Calabrese F, Thiene G, Federspil G, Vettor R. Heart lipid accumulation in obese non-diabetic rats: effect of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2008** Mar;18(3):189-97.

**Palmer RM**, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* **1988** Jun 30;153(3):1251-6.

**Panza JA**, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* **1990** Jul 5;323(1):22-7.

**Parkington HC**, Tonta MA, Coleman HA, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol.* **1995** Apr 15;484 ( Pt 2):469-80.

**Pasimeni G**, Ribaldo MC, Capoccia D, Rossi F, Bertone C, Leonetti F, Santiemma V. Non-invasive evaluation of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity: relationship with insulin resistance. *Microvasc Res.* **2006** Mar;71(2):115-20.

**Penny WF**, Rockman H, Long J, Bhargava V, Carrigan K, Ibriham A, Shabetai R, Ross J Jr, Peterson KL. Heterogeneity of vasomotor response to acetylcholine along the human coronary artery. *J Am Coll Cardiol.* **1995** Apr;25(5):1046-55.

**Perticone F**, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes.* **2001** Jan;50(1):159-65.

**Picchi A**, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res.* **2006** Jul 7;99(1):69-77.

**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** Nov;82(5):1826-38.

**Pollock DM**. Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension. *Hypertension.* **2005** Apr;45(4):477-80. Review.

**Poornima IG**, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res.* **2006** Mar 17;98(5):596-605. Review.

**Potenza MA**, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005** Aug;289(2):H813-22.

**Potenza MA**, Marasciulo FL, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes.* **2006** Dec;55(12):3594-603.

**Potenza MA**, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2009** Sep;297(3):E568-77. Review.

**Prasad SR**, Jagirdar J. Nephrogenic systemic fibrosis/nephrogenic fibrosing dermopathy: a primer for radiologists. *J Comput Assist Tomogr.* **2008** Jan-Feb;32(1):1-3. Review.

**Price DT**, Vita JA, Keaney JF Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal.* **2000** Winter;2(4):919-35. Review.

**Prior HM**, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc Res.* **1998** Mar;37(3):780-90.



**Pyke KE**, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*. **2005** Oct 15;568(Pt 2):357-69. Review.

---

**Quadt JF**, Voss R, ten Hoor F. Prostacyclin production of the isolated pulsatingly perfused rat aorta. *J Pharmacol Methods*. **1982** Jun;7(4):263-70.

**Quyyumi AA**, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 3rd. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. **1995** Apr;95(4):1747-55.

**Quyyumi AA**, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza JA, Cannon RO 3rd. Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P. *Circulation*. **1997** Jan 7;95(1):104-10.

---

**Raitakari OT**, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Celermajer DS. Arterial endothelial dysfunction related to passive smoking is potentially reversible in healthy young adults. *Ann Intern Med*. **1999** Apr 6;130(7):578-81.

**Rask-Madsen C**, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. **2007** Jan;3(1):46-56. Review.

**Rath G**, Dessy C, Feron O. Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *J Physiol Pharmacol*. **2009** Oct;60 Suppl 4:105-9. Review.

**Reaven GM**. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. **1988** Dec;37(12):1595-607. Review.

**Rieber J**, Huber A, Erhard I, Mueller S, Schweyer M, Koenig A, Schiele TM, Theisen K, Siebert U, Schoenberg SO, Reiser M, Klauss V. Cardiac magnetic resonance perfusion imaging for the functional assessment of coronary artery disease: a comparison with coronary angiography and fractional flow reserve. *Eur Heart J*. **2006** Jun;27(12):1465-71.

**Riou LM**, Broisat A, Dimastromatteo J, Vanzetto G, Fagret D, Ghezzi C. The in vivo cardiac kinetics of Tc-99m N-NOET are accelerated in obese, hyperlipidemic Zucker rats. *J Nucl Cardiol*. **2006** Jan-Feb;13(1):75-82.

**Ross R**. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. **1993** Apr 29;362(6423):801-9. Review.

**Rossi GP**, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. **2003** Mar 19;41(6):938-45.

**Rossi R**, Cioni E, Nuzzo A, Origliani G, Modena MG. Endothelial-dependent vasodilation and incidence of type 2 diabetes in a population of healthy postmenopausal women. *Diabetes Care*. **2005** Mar;28(3):702-7.

**Rubanyi GM**, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. **1986** May;250(5 Pt 2):H822-7.

**Rudich A**, Kanety H, Bashan N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends Endocrinol Metab*. **2007** Oct;18(8):291-9. Review.

---

**Sackett DL**, Gibson RW, Bross ID, Pickren JW. Relation between aortic atherosclerosis and the use of cigarettes and alcohol. An autopsy study. *N Engl J Med*. **1968** Dec 26;279(26):1413-20.

**Saeed M**, Higgins CB, Geschwind JF, Wendland MF. T1-relaxation kinetics of extracellular, intracellular and intravascular MR contrast agents in normal and acutely reperfused infarcted myocardium using echo-planar MR imaging. *Eur Radiol*. **2000**;10(2):310-8.

**Saenz de Tejada I**, Goldstein I, Azadzo K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*. **1989** Apr 20;320(16):1025-30.

**Sakurai T**, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. **1992** Mar;13(3):103-8. Review.

- Salerno M**, Beller GA. Noninvasive assessment of myocardial perfusion. *Circ Cardiovasc Imaging*. **2009** Sep;2(5):412-24. Review.
- Saltiel AR**, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. **2001** Dec 13;414(6865):799-806.
- Sármán B**, Tóth M, Somogyi A. Role of endothelin-1 in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. **1998** Jun;14(2):171-5. Review.
- Schächinger V**, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation*. **1995** Oct 15;92(8):2087-94.
- Schächinger V**, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. **2000** Apr 25;101(16):1899-906.
- Schelbert HR**. Coronary circulatory function abnormalities in insulin resistance: insights from positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. **2009** Feb 3;53(5 Suppl):S3-8. Review.
- Schiffrin EL**. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*. **1999** Oct;34(4 Pt 2):876-81.
- Schiffrin EL**. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*. **2005** Jun;43(1):19-29. Review.
- Schini VB**, Kim ND, Vanhoutte PM. The basal and stimulated release of EDRF inhibits the contractions evoked by endothelin-1 and endothelin-3 in aortae of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. **1991**;17 Suppl 7:S267-71.
- Schlaich MP**, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation*. **2004** Dec 14;110(24):3680-6.
- Schmid E**, Hotz-Wagenblatt A, Hacj V, Dröge W. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural basis of redox priming. *FASEB J*. **1999** Sep;13(12):1491-500.
- Schreiber WG**, Schmitt M, Kalden P, Mohrs OK, Kreitner KF, Thelen M. Dynamic contrast-enhanced myocardial perfusion imaging using saturation-prepared TrueFISP. *J Magn Reson Imaging*. **2002** Dec;16(6):641-52.
- Sciacqua A**, Candigliota M, Ceravolo R, Scozzafava A, Sinopoli F, Corsonello A, Sesti G, Perticone F. Weight loss in combination with physical activity improves endothelial dysfunction in human obesity. *Diabetes Care*. **2003** Jun;26(6):1673-8.
- Seddon M**, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*. **2007** Jul 15;75(2):315-26. Review.
- Sharir T**, Germano G, Kang X, Lewin HC, Miranda R, Cohen I, Agafitei RD, Friedman JD, Berman DS. Prediction of myocardial infarction versus cardiac death by gated myocardial perfusion SPECT: risk stratification by the amount of stress-induced ischemia and the poststress ejection fraction. *J Nucl Med*. **2001** Jun;42(6):831-7.
- Shimabukuro M**, Shinzato T, Higa S, Chibana T, Yoshida H, Nagamine F, Murakami K, Takasu N. Enhanced insulin response relates to acetylcholine-induced vasoconstriction in vasospastic angina. *J Am Coll Cardiol*. **1995** Feb;25(2):356-61.
- Shimizu S**, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. **1994** Jun;84(3):301-14.
- Shimokawa H**, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol*. **1988** Dec;95(4):1197-203.
- Shimokawa H**, Vanhoutte PM. Hypercholesterolemia causes generalized impairment of endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets in porcine arteries. *J Am Coll Cardiol*. **1989** May;13(6):1402-8.
- Shimokawa H**, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. **1996** Nov;28(5):703-11.
- Shimokawa H**. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. **1999** Jan;31(1):23-37. Review.

- Shimoni S**, Zoghbi WA, Xie F, Kricsfeld D, Iskander S, Gobar L, Mikati IA, Abukhalil J, Verani MS, O'Leary EL, Porter TR. Real-time assessment of myocardial perfusion and wall motion during bicycle and treadmill exercise echocardiography: comparison with single photon emission computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* **2001** Mar 1;37(3):741-7.
- Shinozaki K**, Hirayama A, Nishio Y, Yoshida Y, Ohtani T, Okamura T, Masada M, Kikkawa R, Kodama K, Kashiwagi A. Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress. *J Am Coll Cardiol.* **2001** Dec;38(7):1821-8.
- Shiode N**, Morishima N, Nakayama K, Yamagata T, Matsuura H, Kajiyama G. Flow-mediated vasodilation of human epicardial coronary arteries: effect of inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Coll Cardiol.* **1996** Feb;27(2):304-10.
- Simone GL**, Mullani NA, Page DA, Anderson BA Sr. Utilization statistics and diagnostic accuracy of a nonhospital-based positron emission tomography center for the detection of coronary artery disease using rubidium-82. *Am J Physiol Imaging.* **1992** Jul-Dec;7(3-4):203-9.
- Smith WL**, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta.* **1991** Apr 24;1083(1):1-17. Review.
- Smith U**, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C. Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* **1999** Nov 18;892:119-26. Review.
- Solzbach U**, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation.* **1997** Sep 2;96(5):1513-9.
- Sorensen KE**, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest.* **1994** Jan;93(1):50-5.
- Spieker LE**, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation.* **2002** Mar 26;105(12):1399-402.
- Steinberg HO**, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.* **1996** Jun 1;97(11):2601-10.
- Stenvinkel P**. Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrol Dial Transplant.* **2001** Oct;16(10):1968-71. Review.
- Stewart RE**, Schwaiger M, Molina E, Popma J, Gacioch GM, Kalus M, Squicciarini S, al-Aouar ZR, Schork A, Kuhl DE. Comparison of rubidium-82 positron emission tomography and thallium-201 SPECT imaging for detection of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* **1991** Jun 15;67(16):1303-10.
- Storey P**, Chen Q, Li W, Edelman RR, Prasad PV. Band artifacts due to bulk motion. *Magn Reson Med.* **2002** Dec;48(6):1028-36.
- 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** Apr;51(4):641-5.
- Stuehr DJ**. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **1997**;37:339-59. Review.
- Sutherland AJ**, Nataatmadja MI, Walker PJ, Cuttle L, Garlick RB, West MJ. Vascular remodeling in the internal mammary artery graft and association with in situ endothelin-1 and receptor expression. *Circulation.* **2006** Mar 7;113(9):1180-8.
- Suwaidi JA**, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* **2000** Mar 7;101(9):948-54.
- Szabó C**, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **2007** Aug;6(8):662-80. Review.

---

**Tack CJ**, Ong MK, Lutterman JA, Smits P. Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone. *Diabetologia.* **1998** May;41(5):569-76.

**Taddei S**, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension.* **1993** Jun;21(6 Pt 2):929-33.

- Taddei S**, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*. **1995** Apr 1;91(7):1981-7.
- Taddei S**, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. **1996** Sep 15;94(6):1298-303.
- Taddei S**, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. **1997** Jan;29(1 Pt 2):274-9.
- Taddei S**, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. **1998** Jun 9;97(22):2222-9.
- Taddei S**, Ghiadoni L, Viridis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation*. **1999** Sep 28;100(13):1400-5.
- Taddei S**, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol*. **2000** May-Jun;13(3):205-10. Review.
- Taddei S**, Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *J Hypertens*. **2002** Sep;20(9):1671-4. Review.
- Taddei ML**, Parri M, Mello T, Catalano A, Levine AD, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Integrin-mediated cell adhesion and spreading engage different sources of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. **2007** Apr;9(4):469-81.
- Takiuchi S**, Fujii H, Kamide K, Horio T, Nakatani S, Hiuge A, Rakugi H, Ogihara T, Kawano Y. Plasma asymmetric dimethylarginine and coronary and peripheral endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. **2004** Sep;17(9):802-8.
- Tawfik HE**, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, Caldwell RW. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*. **2006** Oct;319(1):386-95.
- Taylor PD**, Poston L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol*. **1994** Nov;113(3):801-8.
- Taylor SG**, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci*. **1988** Aug;9(8):272-4. Review.
- Tesauro M**, Rizza S, Iantorno M, Campia U, Cardillo C, Lauro D, Leo R, Turriziani M, Cocciolillo GC, Fusco A, Panza JA, Scuteri A, Federici M, Lauro R, Quon MJ. Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. **2007** Mar;56(3):413-9.
- Tesfamariam B**. Selective impairment of endothelium-dependent relaxations by prostaglandin endoperoxide. *J Hypertens*. **1994** Jan;12(1):41-7.
- Thorin E**, Parent R, Ming Z, Lavallée M. Contribution of endogenous endothelin to large epicardial coronary artery tone in dogs and humans. *Am J Physiol*. **1999** Aug;277(2 Pt 2):H524-32.
- Thorin E**, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch*. **2010** May;459(6):951-8. Review.
- Tiemann K**, Lohmeier S, Kuntz S, Köster J, Pohl C, Burns P, R T, Nanda NC, Lüderitz B, Becher H. Real-Time Contrast Echo Assessment of Myocardial Perfusion at Low Emission Power: First Experimental and Clinical Results Using Power Pulse Inversion Imaging. *Echocardiography*. **1999** Nov;16(8):799-809.
- Ting HH**, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. **1996** Jan 1;97(1):22-8.
- Toblli JE**, DeRosa G, Rivas C, Cao G, Piorno P, Pagano P, Forcada P. Cardiovascular protective role of a low-dose antihypertensive combination in obese Zucker rats. *J Hypertens*. **2003** Mar;21(3):611-20.
- Toblli JE**, Cao G, DeRosa G, Forcada P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart*. **2005** Jan;91(1):80-6.
- Tomita T**, Onda T, Mashiko S, Hamano M, Tomita I. Blood pressure-related changes of endothelium-dependent relaxation in the aorta from SHRSP at developmental ages of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. **1995** Dec;22(1):S139-41.

**Tripathy D**, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. **2003a** Dec;52(12):2882-7.

**Tripathy D**, Aljada A, Dandona P. Free fatty acids (FFA) and endothelial dysfunction; role of increased oxidative stress and inflammation. --to: Steinberg et al. (2002) Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia*. **2003b** Feb;46(2):300-1.

**Tsuboi K**, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **2002** Aug;68-69:535-56. Review.

**Tsutsui JM**, Elhendy A, Anderson JR, Xie F, McGrain AC, Porter TR. Prognostic value of dobutamine stress myocardial contrast perfusion echocardiography. *Circulation*. **2005** Sep 6;112(10):1444-50.

**Tsutsui M**, Shimokawa H, Tanaka S, Kuwaoka I, Hase K, Nogami N, Nakanishi K, Okamatsu S. Endothelial Gi protein in human coronary arteries. *Eur Heart J*. **1994** Sep;15(9):1261-6.

**Underwood SR**, Anagnostopoulos C, Cerqueira M, Ell PJ, Flint EJ, Harbinson M, Kelion AD, Al-Mohammad A, Prvulovich EM, Shaw LJ, Tweddel AC; British Cardiac Society; British Nuclear Cardiology Society; British Nuclear Medicine Society; Royal College of Physicians of London; Royal College of Radiologists. Myocardial perfusion scintigraphy: the evidence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2004** Feb;31(2):261-91. Review.

**Ungvari Z**, Koller A. Endothelin and prostaglandin H(2)/thromboxane A(2) enhance myogenic constriction in hypertension by increasing Ca(2+) sensitivity of arteriolar smooth muscle. *Hypertension*. **2000** Nov;36(5):856-61.

**Utley J**, Carlson EL, Hoffman JI, Martinez HM, Buckberg GD. Total and regional myocardial blood flow measurements with 25 micron, 15 micron, 9 micron, and filtered 1-10 micron diameter microspheres and antipyrine in dogs and sheep. *Circ Res*. **1974** Mar;34(3):391-405.

**Vallance P**, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. **1992** Mar 7;339(8793):572-5.

**Vallance P**, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet*. **1997** May 10;349(9062):1391-2. Review.

**VanBavel E**, Spaan JA. Branching patterns in the porcine coronary arterial tree. Estimation of flow heterogeneity. *Circ Res*. **1992** Nov;71(5):1200-12.

**Van Beek JH**, Roger SA, Bassingthwaite JB. Regional myocardial flow heterogeneity explained with fractal networks. *Am J Physiol*. **1989** Nov;257(5 Pt 2):H1670-80.

**Van Beek JH**, Van Mil HG, King RB, de Kanter FJ, Alders DJ, Bussemaker J. A (13)C NMR double-labeling method to quantitate local myocardial O(2) consumption using frozen tissue samples. *Am J Physiol*. **1999** Oct;277(4 Pt 2):H1630-40.

**Van Linthout S**, Riad A, Dhayat N, Spillmann F, Du J, Dhayat S, Westermann D, Hilfiker-Kleiner D, Noutsias M, Laufs U, Schultheiss HP, Tschöpe C. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. **2007** Sep;50(9):1977-86.

**Vanhoutte PM**, Rimele TJ. Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J Physiol (Paris)*. **1982-1983**;78(7):681-6. Review.

**Vanhoutte PM**, Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*. **1989** Jul;80(1):1-9. Review.

**Vanhoutte PM**. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*. **1997** Nov;18 Suppl E:E19-29. Review.

**Vanhoutte PM**. Dysfonctionnement endothélial et pathologie vasculaire. *Flammarion Médecine sciences, journées de diabétologie*. **2002**;1-15.

**Vanhoutte PM**, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. **2005** Feb;144(4):449-58. Review.

**Vanhoutte PM**, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. **2009a** Jun;196(2):193-222. Review.

- Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.* **2009b** Apr;73(4):595-601. Review.
- Vanzetto G,** Boizel R, Halimi S, Ormezzano O, Belle L, Fagret D, Machecourt J. Effects of a myocardial ischaemia-guided therapeutic program on survival and incidence of coronary events in asymptomatic patients with diabetes: the ARCADIA study. *Diabetes Metab.* **2007** Dec;33(6):459-65.
- Verhaar MC,** Wever RM, Kastelein JJ, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, Rabelink TJ. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. *Circulation.* **1999** Jul 27;100(4):335-8.
- Verma S,** Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* **2002** Feb 5;105(5):546-9. Review.
- Versari D,** Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care.* **2009** Nov;32 Suppl 2:S314-21. Review.
- Veves A,** Akbari CM, Primavera J, Donaghue VM, Zacharoulis D, Chrzan JS, DeGirolami U, LoGerfo FW, Freeman R. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes.* **1998** Mar;47(3):457-63.
- Villalba N,** Martínez P, Briones AM, Sánchez A, Salaíces M, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S, Prieto D. Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2009** Aug;297(2):H696-707.
- Vita JA,** Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* **1990** Feb;81(2):491-7.
- Vogel R,** Indermühle A, Reinhardt J, Meier P, Siegrist PT, Namdar M, Kaufmann PA, Seiler C. The quantification of absolute myocardial perfusion in humans by contrast echocardiography: algorithm and validation. *J Am Coll Cardiol.* **2005** Mar 1;45(5):754-62.
- Vogel RA,** Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* **1997** Feb 1;79(3):350-4.
- Voinea M,** Georgescu A, Manea A, Dragomir E, Manduteanu I, Popov D, Simionescu M. Superoxide dismutase entrapped-liposomes restore the impaired endothelium-dependent relaxation of resistance arteries in experimental diabetes. *Eur J Pharmacol.* **2004** Jan 19;484(1):111-8.
- 
- Wadham C,** Parker A, Wang L, Xia P. High glucose attenuates protein S-nitrosylation in endothelial cells: role of oxidative stress. *Diabetes.* **2007** Nov;56(11):2715-21.
- Warley A,** Powell JM, Skepper JN. Capillary surface area is reduced and tissue thickness from capillaries to myocytes is increased in the left ventricle of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* **1995** Apr;38(4):413-21.
- Wei K,** Jayaweera AR, Firoozan S, Linka A, Skyba DM, Kaul S. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation.* **1998** Feb 10;97(5):473-83.
- Wei K,** Mulvagh SL, Carson L, Davidoff R, Gabriel R, Grimm RA, Wilson S, Fane L, Herzog CA, Zoghbi WA, Taylor R, Farrar M, Chaudhry FA, Porter TR, Irani W, Lang RM. The safety of deFinity and Optison for ultrasound image enhancement: a retrospective analysis of 78,383 administered contrast doses. *J Am Soc Echocardiogr.* **2008** Nov;21(11):1202-6.
- Weich HF,** Strauss HW, Pitt B. The extraction of thallium-201 by the myocardium. *Circulation.* **1977** Aug;56(2):188-91.
- Weigert AL,** Schini VB, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent potentiation of the relaxation of the rat aorta to isoproterenol: role of inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by cyclic GMP. *Pharmacol (Life Sci Adv).* **1994**;13:45-52.
- Weinmann HJ,** Brasch RC, Press WR, Wesbey GE. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol.* **1984** Mar;142(3):619-24.
- Weiss AT,** Berman DS, Lew AS, Nielsen J, Potkin B, Swan HJ, Waxman A, Maddahi J. Transient ischemic dilation of the left ventricle on stress thallium-201 scintigraphy: a marker of severe and extensive coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **1987** Apr;9(4):752-9.
- Weston AH,** Taylor SG, Southerton JS, Bray KM, Newgreen DT, McHarg AD. Potassium channel opening drugs in smooth muscle. In *Proceedings of the VIth International Symposium on Vascular*

Neuroeffector Mechanisms. ed. Bevan JA, Majewski H, Maxwell RA, Story DF. Oxford: IRL Press. **1988**:193-200.

**Wheatcroft SB**, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* **2003** Apr;20(4):255-68. Review.

**Wilke N**, Jerosch-Herold M, Wang Y, Huang Y, Christensen BV, Stillman AE, Ugurbil K, McDonald K, Wilson RF. Myocardial perfusion reserve: assessment with multisection, quantitative, first-pass MR imaging. *Radiology.* **1997** Aug;204(2):373-84.

**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 rubidium-82. *J Nucl Med.* **1994** Oct;35(10):1586-92.

**Williams SB**, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* **1996** Mar 1;27(3):567-74.

**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** Jan-Feb;11(1):60-6.

**Woo KS**, Robinson JT, Chook P, Adams MR, Yip G, Mai ZJ, Lam CW, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Differences in the effect of cigarette smoking on endothelial function in chinese and white adults. *Ann Intern Med.* **1997** Sep 1;127(5):372-5.

---

**Xu B**, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.* **2003** Jul;17(10):1289-91.

**Xu J**, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation.* **2009** Sep 29;120(13):1266-86. Review.

---

**Yanagisawa M**, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988** Sep;85(18):6964-7.

**Yanagisawa M**, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **1988** Mar 31;332(6163):411-5.

**Yanagisawa H**, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S, Clouthier DE, Yanagisawa M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest.* **2000** May;105(10):1373-82.

**Yang D**, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, Félétou M. Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2004** Jun;43(6):815-20.

**Yipintsoi T**, Dobbs WA Jr, Scanlon PD, Knopp TJ, Basingthwaighte JB. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. *Circ Res.* **1973** Nov;33(5):573-87.

**Yoon YS**, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC, Kirchmair R, Bahlman F, Walter D, Curry C, Hanley A, Isner JM, Losordo DW. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation.* **2005** Apr 26;111(16):2073-85.

**Yu M**, Guaraldi MT, Mistry M, Kagan M, McDonald JL, Drew K, Radeke H, Azure M, Purohit A, Casebier DS, Robinson SP. BMS-747158-02: a novel PET myocardial perfusion imaging agent. *J Nucl Cardiol.* **2007** Nov-Dec;14(6):789-98.

---

**Zalba G**, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **2000** May;35(5):1055-61.

- Zeiber AM**, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. **1991** Nov;84(5):1984-92.
- Zeiber AM**. Endothelial modulation of coronary vasomotor tone in humans. Effects of atherosclerosis and risk factors for coronary artery disease. *Arzneimittelforschung*. **1994** Mar;44(3A):439-42. Review.
- Zeiber AM**, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation*. **1995** Sep 1;92(5):1094-100.
- Zeng G**, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. **1996** Aug 15;98(4):894-8.
- Zeng G**, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. **2000** Apr 4;101(13):1539-45.
- Zhang DX**, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007** May;292(5):H2023-31. Review.
- Ziccardi P**, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*. **2002** Feb 19;105(7):804-9.
- Zou MH**, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*. **2004** Mar-Apr;11(2):89-97. Review.



## ***Quantification non invasive de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde par analyse markovienne en imagerie nucléaire SPECT***

**Résumé :** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, et un tiers de ces décès sont causés par la maladie coronaire et la rupture de plaques d'athérome vulnérables. L'altération hétérogène de la microcirculation coronaire est un phénomène précoce lié à de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire qui peut fortement présager du développement ultérieur de la maladie coronaire, et conduire à l'apparition d'une hétérogénéité de la perfusion myocardique. La médecine nucléaire permet l'étude de la perfusion myocardique en routine clinique grâce à la réalisation de scintigraphies après injection d'un traceur radioactif du débit sanguin coronaire. L'analyse des images scintigraphiques de la perfusion permet actuellement le dépistage de l'ischémie myocardique, mais la capacité de la technique à mesurer l'hétérogénéité de la perfusion dans des zones apparemment normalement perfusées est inconnue. **La première partie de cette thèse porte sur une étude clinique rétrospective visant à déterminer la faisabilité de la quantification de l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde mesurée par tomographie d'émission monophotonique (TEMP) au Thallium-201** chez des patients diabétiques par rapport à des sujets sains. L'étude clinique a démontré la capacité du Thallium-201 en imagerie TEMP de routine à quantifier une hétérogénéité de la perfusion du myocarde plus importante chez des patients diabétiques par rapport à des individus normaux. **La seconde partie de cette thèse teste l'hypothèse que l'hétérogénéité de la perfusion du myocarde pourrait être quantifiée en imagerie du petit animal TEMP au Thallium-201 et/ou au Technetium-99m-MIBI** par une étude expérimentale chez deux modèles animaux de diabète, et serait en corrélation avec des altérations histologiques. L'absence de différence d'hétérogénéité de la perfusion myocardique entre les animaux diabétiques et contrôles suggère que les modèles animaux sont peu adaptés, ou que la technologie actuellement disponible ne semble pas satisfaisante pour obtenir des résultats similaires à l'étude clinique.

**Mots-clés :** Médecine nucléaire, hétérogénéité, perfusion myocardique, dysfonction endothéliale.

## ***Noninvasive quantification of myocardial perfusion heterogeneity by markovian analysis in SPECT nuclear imaging***

**Summary :** Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide, and third of these deaths are caused by coronary artery disease and rupture of vulnerable atherosclerotic plaques. The heterogeneous alteration of the coronary microcirculation is an early phenomenon associated with many cardiovascular risk factors that can strongly predict the subsequent development of coronary artery disease, and lead to the appearance of myocardial perfusion heterogeneity. Nuclear medicine allows the study of myocardial perfusion in clinical routine through scintigraphic scans performed after injection of a radioactive tracer of coronary blood flow. Analysis of scintigraphic perfusion images currently allows the detection of myocardial ischemia, but the ability of the technique to measure the perfusion heterogeneity in apparently normally perfused areas is unknown. **The first part of this thesis focuses on a retrospective clinical study to determine the feasibility of myocardial perfusion heterogeneity quantification measured by Thallium-201 single photon emission computed tomography (SPECT) in diabetic patients compared with healthy subjects.** The clinical study has demonstrated the ability of routine thallium-201 SPECT imaging to quantify greater myocardial perfusion heterogeneity in diabetic patients compared with normal subjects. **The second part of this thesis tests the hypothesis that the myocardial perfusion heterogeneity could be quantified in small animal SPECT imaging by Thallium-201 and/or Technetium-99m-MIBI** in an experimental study using two animal models of diabetes, and is correlated with histological changes. The lack of difference in myocardial perfusion heterogeneity between control and diabetic animals suggests that animal models are poorly suited, or that the technology currently available does not seem satisfactory to obtain similar results as the clinical study.

**Keywords :** Nuclear medicine, heterogeneity, myocardial perfusion, endothelial dysfunction.