



**HAL**  
open science

**Particularités de l'athérosclérose du sujet non  
diabétique, diabétique de type 2, et/ou stéatosique non  
alcoolique : de la physiopathologie aux techniques  
d'imagerie non invasives**

Romaric Loffroy

► **To cite this version:**

Romaric Loffroy. Particularités de l'athérosclérose du sujet non diabétique, diabétique de type 2, et/ou stéatosique non alcoolique : de la physiopathologie aux techniques d'imagerie non invasives. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10282 . tel-00825146

**HAL Id: tel-00825146**

**<https://theses.hal.science/tel-00825146v1>**

Submitted on 23 May 2013

**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.

**THESE**

Délivrée par

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE**

Pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES**

(Arrêté du 7 août 2006)

**Présentée et soutenue publiquement le 15 Décembre 2010**

par

**Romaric LOFFROY**

**Né le 09 Juillet 1976 à Dijon (21)**

**TITRE:**

**PARTICULARITES DE L'ATHEROSCLEROSE DU SUJET NON DIABETIQUE,  
DIABETIQUE DE TYPE 2, ET/OU STEATOSIQUE NON ALCOOLIQUE:  
DE LA PHYSIOPATHOLOGIE AUX TECHNIQUES D'IMAGERIE NON INVASIVES**

**Directeur de Thèse :**

**Professeur Philippe DOUEK**

**JURY :**

**Professeur Denis KRAUSE (Dijon), Président**

**Professeur Jean-Pierre PRUVO (Lille), Rapporteur**

**Professeur Marc SAPOVAL (Paris), Rapporteur**

**Professeur Philippe MOULIN (Lyon), Examineur**

**Professeur Didier REVEL (Lyon), Examineur**

**Professeur Philippe DOUEK (Lyon), Directeur**

---

**TITRE:**

Particularités de l'athérosclérose du sujet non diabétique, diabétique de type 2, et/ou stéatosique non alcoolique: de la physiopathologie aux techniques d'imagerie non invasives.

---

**RESUME:**

L'athérosclérose est un problème de santé publique majeur puisque elle représente aujourd'hui la principale cause de décès dans les pays occidentalisés. Il est donc important de comprendre les mécanismes participant à la progression et aux complications de cette entité anatomoclinique. Nous nous sommes attachés dans ce travail de thèse à démontrer la place et l'apport potentiel de l'imagerie non invasive non expérimentale dans la mise en exergue des particularités de l'athérosclérose carotidienne et/ou coronarienne, et dans la stratégie de dépistage de ses complications chez le sujet non diabétique et diabétique de type 2, en fonction de l'existence ou non d'une stéatose hépatique non alcoolique. Nous présentons notamment dans ce travail, issu en partie de l'exploitation des données cliniques, biologiques et radiologiques de trois protocoles hospitaliers de recherche clinique, les différentes publications scientifiques internationales auxquelles il a donné lieu.

---

**TITLE:**

Characteristics of atherosclerosis in nondiabetic, type 2 diabetic, and/or nonalcoholic steatotic subjects: from pathophysiology to noninvasive imaging techniques.

---

**SUMMARY:**

Atherosclerosis is a major public health problem and is one of the major causes of death in the developed western world today. It is therefore of utmost importance that we understand the mechanisms involved in the evolution and progression of this disease and its associated complications. With the work done for this thesis, we tried to bring forth the importance of non invasive clinical imaging to study the pattern of evolution of atherosclerosis involving the carotid and/or coronary arteries. We also present the role played by imaging in prevention and early diagnosis of associated complications in non diabetic and type 2 diabetic patients, presenting with or without non alcoholic hepatic steatosis. In this study, we evaluated three different clinical research protocols used involving the clinical findings, biochemical as well as radiological examination results. The results of these protocols have been the basis for several peer reviewed international publications till date.

---

**DISCIPLINE:**

Sciences de la santé.

---

**MOTS-CLES:**

Athérosclérose; Diabète de type 2; Stéatose hépatique; Physiopathologie; Imagerie non invasive.  
Atherosclerosis; Type 2 diabetes; Hepatic steatosis; Pathophysiology; Noninvasive imaging.

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE:**

CREATIS-LRMN, UMR CNRS 5515, INSERM U630, INSA - Bâtiment Blaise Pascal, 7, avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne cedex, France.

*A mes maîtres et membres du jury,*

*Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger et de juger ce travail.*

*A toutes celles et tous ceux qui, de près ou de loin, ont guidé mes pas dans la  
réalisation de ce travail et dans le reste,*

*Ils se reconnaîtront peut-être.*

*A tous mes amis,*

*Ils se reconnaîtront sûrement.*

*A toute ma famille et belle-famille,*

*Merci pour votre soutien de tous les instants.*

*A Caroline et Louise,*

*Avec tout mon amour.*

# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1: ATHEROSCLEROSE.....</b>	<b>21</b>
<b>1 – Données actuelles.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 – Significativité clinique.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1 – Initiation de la lésion d’athérosclérose (lésions de types I et II).....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2 – Progression de la lésion d’athérosclérose (lésions de types III et IV) .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3 – La plaque d’athérosclérose mature (type V).....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4 – Plaque d’athérosclérose compliquées ou à risque (type VI) .....</b>	<b>28</b>
<b>1.3 – Rôle de l’imagerie non invasive in vivo .....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.1 – Détection de la maladie athéromateuse « générale ».....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1.1 – Epaisseur intima-média carotidienne .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1.2 – Score calcique coronaire .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3.2 – Analyse du degré de sténose .....</b>	<b>33</b>
<b>1.3.3 – Imagerie haute résolution de la plaque d’athérosclérose.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.3.1 – Scanner multibarrettes.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3.3.2 – IRM haute résolution .....</b>	<b>36</b>
<b>2 – Protocole COCASE .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 – Titre .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 – Promoteur .....</b>	<b>39</b>

<b>2.3 – Investigateur principal.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 – Contexte scientifique .....</b>	<b>40</b>
2.4.1 – Généralités.....	40
2.4.2 – Epidémiologie des AVC ischémiques .....	41
2.4.3 – Conduite habituelle du bilan étiologique d’un infarctus artériel cérébral.....	42
2.4.4 – Place actuelle du scanner dans les explorations cardiaques et des TSA: bénéfice direct lié à l’utilisation du scanne multibarrettes .....	43
<b>2.5 – Objectifs.....</b>	<b>44</b>
2.5.1 – Hypothèses de recherche.....	44
2.5.2 – Objectif principal.....	44
2.5.3 – Objectifs secondaires .....	45
<b>2.6 – Type d’étude.....</b>	<b>45</b>
<b>2.7 – Critères d’évaluation.....</b>	<b>46</b>
2.7.1 – Principaux .....	46
2.7.2 – Secondaires.....	47
<b>2.8 – Descriptif de la population étudiée .....</b>	<b>48</b>
2.8.1 – Sélection.....	48
2.8.2 – Critères d’inclusion .....	48
2.8.3 – Critères d’exclusion .....	48
<b>2.9 – Méthodologie.....</b>	<b>49</b>
2.9.1 – Déroulement pratique .....	49
2.9.2 – Examens complémentaires.....	50
2.9.2.1 – Scanner .....	50
2.9.2.2 – Echo-Doppler des troncs supra-aortiques .....	52
2.9.2.3 – Angio-IRM.....	52
2.9.2.4 – Echographie transoesophagienne.....	53

<b>CHAPITRE 2: ATHEROSCLEROSE ET DIABETE DE TYPE 2 .....</b>	<b>55</b>
<b>1 – Données actuelles.....</b>	<b>55</b>
<b>1.1 – Significativité clinique .....</b>	<b>55</b>
<b>1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques .....</b>	<b>56</b>
<b>1.2.1 – Diabète de type 2 et athérosclérose .....</b>	<b>57</b>
1.2.1.1 – Rôle de l’inflammation.....	57
1.2.1.2 – Anomalies lipidiques.....	58
1.2.1.3 – Dysfonction endothéliale .....	59
1.2.1.4 – Activation des monocytes circulants .....	60
1.2.1.5 – Recrutement et adhésion leucocytaire .....	61
1.2.1.6 – Produits de glycation avancée des protéines .....	62
1.2.1.7 – Stress oxydatif.....	63
1.2.1.8 – Instabilité de la plaque .....	64
1.2.1.9 – Remodelage artériel.....	65
<b>1.2.2 – Diabète de type 2 et athérombose .....</b>	<b>66</b>
1.2.2.1 – Anomalies plaquettaires.....	67
1.2.2.2 – Anomalies de la coagulation.....	68
1.2.2.3 – Anomalies de la fibrinolyse .....	70
1.2.2.4 – Hyperglycémie et thrombose .....	71
<b>1.3 – Rôle de l’imagerie non invasive in vivo .....</b>	<b>71</b>
<b>1.3.1 – Diabète de type 2 et athérosclérose carotidienne .....</b>	<b>72</b>
1.3.1.1 – Epaisseur intima-média.....	72
1.3.1.2 – Imagerie directe de la plaque d’athérosclérose.....	74
<b>1.3.2 – Diabète de type 2 et athérosclérose coronarienne.....</b>	<b>75</b>
1.3.2.1 – Score calcique coronaire .....	75
1.3.2.2 – Imagerie directe de la plaque d’athérosclérose.....	78
<b>2 – Protocole CAPHEPLAD.....</b>	<b>81</b>

<b>2.1 – Titre .....</b>	<b>81</b>
<b>2.2 – Promoteur .....</b>	<b>82</b>
<b>2.3 – Investigateur principal.....</b>	<b>82</b>
<b>2.4 – Contexte scientifique .....</b>	<b>82</b>
<b>2.5 – Objectifs.....</b>	<b>85</b>
<b>2.5.1 – Hypothèses de recherche.....</b>	<b>85</b>
<b>2.5.2 – Objectif principal.....</b>	<b>85</b>
<b>2.5.3 – Objectifs secondaires .....</b>	<b>86</b>
<b>2.6 – Type d'étude.....</b>	<b>86</b>
<b>2.7 – Critères d'évaluation.....</b>	<b>86</b>
<b>2.7.1 – Principaux .....</b>	<b>86</b>
<b>2.7.2 – Secondaires.....</b>	<b>87</b>
<b>2.8 – Descriptif de la population étudiée .....</b>	<b>87</b>
<b>2.8.1 – Sélection.....</b>	<b>87</b>
<b>2.8.2 – Critères d'inclusion .....</b>	<b>88</b>
<b>2.8.3 – Critères d'exclusion.....</b>	<b>89</b>
<b>2.9 – Méthodologie.....</b>	<b>90</b>
<b>2.9.1 – Déroulement pratique .....</b>	<b>90</b>
<b>2.9.2 – Examens complémentaires.....</b>	<b>91</b>
<b>2.9.2.1 – Dosages biologiques .....</b>	<b>91</b>
<b>2.9.2.2 – Mesure de la vasodilatation endothélium dépendante .....</b>	<b>92</b>
<b>2.9.2.3 – Echo-Doppler carotidien .....</b>	<b>92</b>
<b>2.9.2.4 – IRM carotidienne.....</b>	<b>92</b>
<b>2.9.2.5 – Scanner coronarien.....</b>	<b>93</b>

### **CHAPITRE 3: ATHEROSCLEROSE, DIABETE DE TYPE 2 ET STEATOSE**

<b>HEPATIQUE NON ALCOOLIQUE .....</b>	<b>95</b>
---------------------------------------	-----------



<b>1 – Données actuelles</b> .....	<b>95</b>
<b>1.1 – Significativité clinique</b> .....	<b>95</b>
<b>1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques</b> .....	<b>97</b>
1.2.1 – Possibles mécanismes biologiques reliant stéatose et athérosclérose accélérée.....	97
1.2.2 – Physiopathologie de la stéatose du diabétique de type 2 .....	99
<b>1.3 – Rôle de l’imagerie non invasive in vivo</b> .....	<b>100</b>
1.3.1 – Diagnostic et quantification de la stéatose.....	100
1.3.2 – Stéatose et maladies cardiovasculaires chez le non diabétique et le diabétique	
de type 2.....	103
1.3.2.1 – Liens entre stéatose et complications vasculaires du diabète.....	103
1.3.2.2 – Liens entre stéatose et marqueurs d’athérosclérose préclinique.....	104
1.3.2.3 – Liens entre stéatose et prévalence des maladies cardiovasculaires .....	107
1.3.2.4 – Liens entre stéatose et incidence des maladies cardiovasculaires.....	109
<b>2 – Protocole GEPSAD</b> .....	<b>112</b>
<b>2.1 – Titre</b> .....	<b>112</b>
<b>2.2 – Promoteur</b> .....	<b>112</b>
<b>2.3 – Investigateur principal</b> .....	<b>112</b>
<b>2.4 – Contexte scientifique</b> .....	<b>113</b>
<b>2.5 – Objectifs</b> .....	<b>115</b>
2.5.1 – Hypothèses de recherche.....	115
2.5.2 – Objectif principal.....	115
2.5.3 – Objectifs secondaires .....	116
<b>2.6 – Type d’étude</b> .....	<b>116</b>
<b>2.7 – Critères d’évaluation</b> .....	<b>116</b>
2.7.1 – Principaux .....	116
2.7.2 – Secondaires.....	117
<b>2.8 – Descriptif de la population étudiée</b> .....	<b>117</b>

2.8.1 – Sélection.....	117
2.8.2 – Critères d’inclusion .....	117
2.8.3 – Critères d’exclusion.....	117
<b>2.9 – Méthodologie.....</b>	<b>118</b>
2.9.1 – Déroulement pratique .....	118
2.9.2 – Examens complémentaires.....	119
2.9.2.1 – Dosages biologiques .....	119
2.9.2.2 – IRM hépatique .....	120
2.9.2.3 – Echographie carotidienne .....	123
 <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	 <b>127</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	 <b>129</b>
 <b>ANNEXE A .....</b>	 <b>159</b>
 <b>Publication n° 1 (Radiology): “MDCT of heart, extra- and intracranial arteries in etiological workup of ischemic stroke”</b>	
 <b>ANNEXE B .....</b>	 <b>189</b>
 <b>Publication n° 2 (Journal of Magnetic Resonance Imaging): “Modified electrocardiograph-triggered black-blood turbo spin-echo technique to improve T1-weighting in contrast-enhanced MRI of atherosclerotic carotid arteries”</b>	
 <b>ANNEXE C .....</b>	 <b>197</b>
 <b>Publication n° 3 (Archives of Cardiovascular Diseases): “Noninvasive assessment of the prevalence and characteristics of coronary atherosclerotic plaques by multidetector computed</b>	

**tomography in asymptomatic type 2 diabetic patients at high risk of significant coronary artery disease: a preliminary study”**

**ANNEXE D ..... 209**

**Publication n° 4 (Atherosclerosis): “Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT)”**

**ANNEXE E ..... 219**

**Publication n° 5 (Radiology): “Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy”**

**ANNEXE F..... 229**

**Publication n° 6 (European Radiology): “Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy”**

**ANNEXE G..... 239**

**Publication n° 7 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism): “Nonalcoholic fatty liver is not associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients”**

**ANNEXE H..... 245**

**Publication n° 8 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism): “Specifically-PNPLA3-mediated accumulation of liver fat in obese patients with type 2 diabetes”**

**ANNEXE I ..... 255**

**Publication n° 9 (Diabetic Medicine): “Liver fat content is negatively associated with atherosclerotic carotid plaque in type 2 diabetic patients”**

## ABREVIATIONS

IDM : Infarctus du Myocarde

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

RCV : Risque Cardio-Vasculaire

FDRCV : Facteur de Risque Cardio-Vasculaire

LDL : Low Density Lipoprotein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

NO : Nitroxyde d'Azote

EIMc : Epaisseur Intima-Média Carotidienne

RR : Risque Relatif

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

TSA : Troncs Supra-Aortiques

DIR : Double Inversion Récupération

TSE : Turbo-Spin Echo

DP : Densité de Proton

CRP : Protéine C-Réactive

ECG : Electrocardiogramme

USPIO : Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide

ETO : Echographie Trans-Oesophagienne

ETT : Echographie Trans-Thoracique

AIT : Accident Ischémique Transitoire

MPR : Multi-Planar Reconstruction

MIP : Maximal Intensity Projection

CTDI<sub>w</sub> : Weighted Computed Tomography Dose Index

DLP : Produit Dose-Longueur

PACS : Système Informatique

DSMB : Data Safety and Monitoring Board

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

ASIA : Anévrisme du Septum Inter Atrial

FOP : Foramen Ovale Perméable

SCC : Score Calcique Coronaire

ECST : European Carotid Surgery Trial

NASCET : North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial

CCPPRB : Comité Consultatif des Personnes se Prêtant à la Recherche Biomédicale

AGEs : Advanced Glycation End Products

MMP : Matrix Métallo-Protéinase

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic Steato-Hepatitis

MTP : Microsomal Transfer Protein

## INTRODUCTION

L'athérosclérose est un problème de santé publique majeur puisque elle représente la principale cause des décès dans les pays occidentalisés [1]. Il s'agit d'un phénomène diffus touchant l'ensemble des artères. Même si les signes cliniques de la maladie ne surviennent généralement qu'après la cinquième décennie, l'athérosclérose est un processus débutant très précocement dans la vie de l'individu. L'athérosclérose est une pathologie artérielle correspondant à une pathologie inflammatoire chronique liée à l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les cellules inflammatoires, macrophages dérivés des monocytes circulants et lymphocytes T, et les éléments cellulaires de la paroi artérielle [2,3]. Cette inflammation chronique conduit à un processus réactionnel cicatriciel de la paroi artérielle impliquant les cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire. Certaines de ces lésions inflammatoires, trop importantes ou trop brutales, vont conduire à des lésions qui vont se compliquer par une rupture ou une érosion de plaque et une thrombose ou une embolie artérielle. Les présentations cliniques de la maladie athéroscléreuse sont évidemment multiples et fonction de l'artère touchée. L'atteinte coronaire et l'infarctus du myocarde (IDM) dominent par leur fréquence et leur sévérité suivis de près par les atteintes carotidiennes et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Mais la maladie reste souvent silencieuse et le patient le plus souvent asymptomatique. Les études épidémiologiques montrent cependant que le développement de l'athérosclérose ne doit pas être considéré comme un héritage inéluctable de l'industrialisation et de l'urbanisation.

Le diabète sucré est un accélérateur puissant des maladies artérielles ischémiques dans leurs localisations au myocarde, au cerveau et aux membres inférieurs. Les diabétiques paient

donc un lourd tribut aux maladies artérielles. Le terme de macroangiopathie diabétique a été introduit par opposition à la microangiopathie pour définir les lésions des artères de gros et moyen calibre observées chez le diabétique. Elle associe un athérome accéléré et une artériosclérose prématurée. Elle se distingue de l'athérome classique par sa précocité d'apparition, la coexistence fréquente de localisations multiples sur les coronaires, les artères périphériques, les artères cérébrales et sa gravité évolutive [4]. L'analyse du lien entre diabète et athérosclérose reste difficile car, chez le diabétique, les facteurs de risque sont très souvent multiples et intriqués et subissent également des interactions nombreuses. Il convient également de distinguer les mécanismes à l'origine de la lésion artérielle et ceux qui en précipitent les manifestations cliniques, en particulier la thrombose et l'ischémie. Enfin, les mécanismes en cause sont en partie différents selon le type de diabète.

Par ailleurs, le risque cardiovasculaire (RCV) lié à l'athérosclérose est augmenté par l'existence d'un syndrome métabolique qui associe insulino-résistance, troubles glucidiques, anomalies lipidiques, et obésité androïde, et auquel la stéatose hépatique non alcoolique est fortement liée [5]. La difficulté est donc de déterminer si la relation entre stéatose et RCV est indépendante des anomalies métaboliques accompagnant la stéatose hépatique. Si dans la population générale la présence d'une stéatose hépatique est associée à un plus grand risque de pathologie carotidienne ou coronarienne [6-9], ce lien n'a pas été démontré de façon certaine dans la population diabétique. En effet, l'évaluation de l'influence de la stéatose sur les complications vasculaires du diabète a donné lieu à des résultats discordants [8,10]. Or, même si la prévalence de la stéatose varie selon les études et surtout le mode de diagnostic utilisé pour confirmer son existence, on estime que la stéatose hépatique non alcoolique représente la première cause d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux avec une prévalence estimée entre 10 et 24% de la population générale et entre 25 et 75% de la population diabétique [11]. Il est donc important de comprendre les mécanismes qui



participent à la progression et aux complications de l'athérosclérose chez les patients diabétiques, en fonction notamment de la présence ou non d'une stéatose hépatique.

Dans le cadre de la lutte contre les maladies cardiovasculaires, la prévention occupe une place primordiale. L'identification de facteurs responsables de la progression de la plaque ainsi que de marqueurs cliniques, biologiques ou radiologiques du risque de rupture de plaque va permettre d'organiser la stratégie de prévention à différents niveaux. La prévention primaire s'adresse aux patients indemnes de toute pathologie cardiaque ou vasculaire cliniquement décelable. Son objectif est de dépister et de prendre en charge les facteurs de RCV (FDRCV) pour mettre en place des mesures hygiéno-diététiques et thérapeutiques afin d'éviter, limiter ou retarder le développement d'une pathologie cardiovasculaire. La prévention primo-secondaire et secondaire concerne les patients présentant un athérome constitué ou compliqué. Dans cette population, un renforcement des mesures de la prévention primaire est nécessaire, associé à des thérapeutiques spécifiques dans le choix desquelles les marqueurs de risque radiologiques jouent un rôle très important. Ainsi, la mise en évidence de marqueurs du RCV va permettre d'adapter la prévention au niveau de l'individu ou de la population. Elle va aussi permettre d'évaluer le risque global de l'individu pour adapter l'intensité de la lutte contre les facteurs athérogènes.

Par conséquent, nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse à différents aspects de l'utilisation pratique des techniques d'imagerie non invasives pour mettre en évidence les liens existants entre athérosclérose, diabète de type 2 et stéatose hépatique non alcoolique. Dans ce travail de thèse, nous nous proposons donc de résumer les concepts récents sur la physiopathologie et les particularités de l'athérosclérose du sujet non diabétique et du sujet diabétique de type 2, selon l'existence ou non d'une stéatose hépatique non alcoolique, puis d'analyser la place et les apports potentiels de l'imagerie non invasive dans la mise en exergue de ces particularités et dans la stratégie de dépistage et de prévention des

complications de l'athérosclérose dans ces différentes populations. Notre travail s'est limité à l'étude de l'athérosclérose carotidienne et/ou coronarienne par les techniques d'imagerie non invasives utilisées en pratique clinique (échographie, scanner multibarrettes et imagerie par résonance magnétique). Nous présenterons notamment dans ce travail, qui a été réalisé en partie dans le laboratoire d'accueil CREATIS-LRMN, UMR CNRS 5515, INSERM U630, Villeurbanne, France, sous la direction du Professeur Philippe DOUEK, les différentes publications scientifiques auxquelles il a donné lieu. Il est le fruit d'une collaboration entre les équipes de radiologie et d'endocrinologie du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (Pr Denis KRAUSE, Pr Jean-Michel PETIT; Hôpital du Bocage) et des Hospices Civils de Lyon (Pr Philippe DOUEK, Pr Philippe MOULIN; Hôpital Cardiologique), et est issu en partie de l'exploitation des données cliniques, biologiques et radiologiques de trois protocoles hospitaliers de recherche clinique: le protocole COCASE (COeur, CARotides, Scanner multibarrettes, Etiologie des infarctus cérébraux) dont l'investigateur principal est le Professeur Philippe DOUEK (Lyon), le protocole CAPHEPLAD (CAractérisation PHEnotypique des PLAques Athéromateuses chez les sujets Diabétiques en fonction de l'existence d'un syndrome métabolique associé) dont l'investigateur principal est le Docteur Sophie BERNARD (Lyon), et le protocole GEPSAD (GENetic Polymorphisms, Steatosis And Diabetes) dont l'investigateur principal est le Professeur Jean-Michel PETIT (Dijon).

# **CHAPITRE 1:**

## **ATHEROSCLEROSE**

### **1 – Données actuelles**

#### **1.1 – Significativité clinique**

Les maladies cardiovasculaires, au premier rang desquelles les cardiopathies ischémiques et les AVC, constituent la première cause de mortalité et de morbidité en France avec chaque année 120 000 IDM et 130 000 AVC [12]. L'athérosclérose est la cause commune de ces maladies. Elle apparaît ainsi comme la première cause des décès dans les pays occidentalisés et apparaît en nette progression dans les pays en voie de développement, comme si cette pathologie était le reflet inéluctable du progrès social. Elle est cependant très ancienne dans l'histoire des maladies, et apparaît en fait comme une maladie dégénérative de l'homme. Les concepts se sont cependant profondément modifiés et les progrès récents de la recherche fondamentale et clinique ont permis de comprendre que l'athérosclérose est une pathologie artérielle correspondant à une pathologie inflammatoire chronique liée à l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les cellules inflammatoires, macrophages dérivés des monocytes circulants et lymphocytes T, et les éléments cellulaires de la paroi artérielle. Cette inflammation chronique conduit à un processus réactionnel cicatriciel de la paroi artérielle impliquant les cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire et aboutissant à la formation des lésions complexes. Si l'importance du phénomène aboutit parfois à une réduction du calibre artériel, souvent la cicatrisation de la lésion permet sa stabilisation dans le temps. Malheureusement, certaines de ces lésions

inflammatoires trop importantes ou trop brutales vont conduire à des lésions qui vont se compliquer par une rupture ou une érosion de la plaque et une thrombose artérielle aboutissant à la complication ultime de cette pathologie, l'obstruction brutale du vaisseau et la survenue d'événements cliniques majeurs, infarctus du myocarde ou accidents vasculaires cérébraux [12].

## **1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques**

L'athérosclérose est considérée actuellement comme une réponse inflammatoire aux lésions de la paroi artérielle. D'un point de vue physiopathologique l'athérosclérose correspond à une réponse pariétale active, principalement endothéliale et intimale à différents types d'agressions: chimiques et mécaniques et peut-être infectieuses. Une plaque d'athérome non compliquée contient quatre types de cellules: les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les lymphocytes T. Une plaque d'athérome ne débute pas forcément par une lésion « mécanique » de l'endothélium, mais le plus souvent par une lésion « biochimique », induisant une dysfonction endothéliale. Il est maintenant démontré que l'hypercholestérolémie (augmentation du LDL-cholestérol) et les hypertriglycéridémies (par augmentation des concentrations de petites-VLDL et des particules résiduelles des chylomicrons) provoquent des dysfonctions endothéliales responsables du développement de l'athérosclérose. L'hypercholestérolémie, même en l'absence de dépôts lipidiques vasculaires, inhibe la vasorelaxation artérielle dépendante de la libération de nitroxyde d'azote (NO) par l'endothélium, et augmente la libération par cet endothélium d'un puissant vasoconstricteur, l'endothéline-1. Les effets conjugués de la diminution de la libération de NO et de l'augmentation de la sécrétion d'endothéline-1 favorisent les phénomènes de vasospasme et la prolifération des cellules musculaires lisses qui participent à la formation de la plaque d'athérome. De plus la diminution de la libération de NO augmente le risque d'agrégation des

plaquettes et donc le risque de thrombose [13].

### **1.2.1 – Initiation de la lésion d'athérosclérose (lésions de types I et II)**

L'accumulation de lipoprotéines athérogènes contenant de l'apo-B (LDL, petites-VLDL) au niveau intimal reflète un déséquilibre entre leurs flux d'entrée et de sortie. Les flux d'entrée sont augmentés par les augmentations des concentrations plasmatiques de ces lipoprotéines, ainsi que par l'augmentation de la perméabilité endothéliale (lésions endothéliales et dysfonction endothéliale), les flux de sortie peuvent être diminués du fait de la présence de protéoglycanes et de collagène qui fixent les LDL dans le sous-endothélium. Les facteurs hémodynamiques (pression, forces de cisaillement, turbulences, stagnation) modifient le transfert des lipoprotéines athérogènes à travers l'endothélium, ainsi que leur durée de résidence dans le sous-endothélium. L'athérosclérose survient préférentiellement au niveau des bifurcations et des courbures artérielles où les turbulences et les forces de cisaillement négatives peuvent induire une activation endothéliale qui aura pour conséquence:

- d'augmenter la perméabilité aux macromolécules et donc aux lipoprotéines athérogènes;
- d'induire l'expression d'intégrines et de protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) à la surface de l'endothélium qui permettront aux monocytes de se lier à l'endothélium par l'intermédiaire de leurs récepteurs comme les intégrines VLA-4 (alpha4 bêta2) et LFA-1 (alphaL bêta2, CD IIa/CD18); ces monocytes pourront ensuite passer entre les cellules endothéliales et pénétrer dans l'intima artériel;
- d'induire un stress oxydant, particulièrement par une augmentation de l'activité de la NADH/NADPH oxydase endothéliale qui produit l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Les lipoprotéines athérogènes et particulièrement les LDL infiltrées dans le sous endothélium seront oxydées par les radicaux libres oxygénés libérés par les cellules

endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. L'oxydation des LDL débute par la peroxydation de leurs acides gras polyinsaturés et se propage en partie grâce à une enzyme la PAF-AH (Platelet Activating Factor Acetylhydrolase) qui possède une activité phospholipase A2. La peroxydation lipidique conduit à la fragmentation des acides gras polyinsaturés avec formation d'aldéhydes et de cétones. Les aldéhydes se fixent sur les résidus lysine de l'apo B100 des LDL, qui dès lors ne reconnaissent plus le LDL-récepteur mais les différents récepteurs éboueurs (scavenger) exprimés à la surface des macrophages et des cellules musculaires lisses. L'apo B100 finira par se fragmenter en une multitude de petits peptides. Les LDL ainsi modifiées constituent les LDL-oxydées (Ox-LDL) [13].

Les molécules d'adhésion sont peu exprimées à la surface de l'endothélium sain, mais sont induites par les Ox-LDL et les cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor alpha [TNFalpha] et interleukine-1 [IL1]). Les Ox-LDL initient probablement l'activation de l'endothélium, alors que les cytokines pro-inflammatoires exprimées secondairement par les cellules de la plaque interviennent pour amplifier et pérenniser l'inflammation. Les Ox-LDL manifestent un pouvoir chimioattractant vis-à-vis des monocytes attachés à l'endothélium vasculaire et favorisent de plus leur conversion en macrophages dès qu'ils ont pénétré dans le sous-endothélium; enfin elles inhibent la mobilité de ces macrophages devenus résidents et empêchent ainsi leur retour vers le compartiment sanguin en les piégeant dans le sous-endothélium. Les Ox-LDL provoquent l'augmentation de l'expression du facteur chimiotactique des monocytes (MCP-1) par les macrophages et les cellules musculaires lisses de la plaque.

L'interleukine 8 (IL8) exprimée par les macrophages et les cellules musculaires lisses intervient en immobilisant les monocytes sur l'endothélium par le biais de l'interaction VCAM-1-VLA4. MCP-1 et l'IL8 sont également induites par les cytokines présentes dans la plaque (TNFalpha, IL1, IL6, IL12, IL15, IL18, oncostatine-M, IFNgamma). Les Ox-LDL

sont capables d'activer les lymphocytes T et d'accroître l'expression de récepteurs de l'interleukine 2 et des antigens HLA-DR [12,13].

Les macrophages sous-endothéliaux captent des quantités importantes de cholestérol en incorporant les Ox-LDL par l'intermédiaire de récepteurs dits éboueurs (scavenger) (SR-AI, SR-AII, CD36, CD68). Il n'existe pas de mécanisme de régulation capable de limiter la capture des Ox-LDL par les macrophages, de ce fait les macrophages se surchargent de cholestérol et se transforment en cellules spumeuses, dans lesquelles il est possible d'observer des dépôts de cholestérol. Selon la classification de l'« American Heart Association » (AHA) il s'agit du type I des lésions successives d'athérosclérose. L'accumulation de cellules spumeuses dans le sous-endothélium correspond à la strie lipidique et au type II des lésions. Les types I et II apparaissent entre les âges de zéro à dix ans et sont asymptomatiques.

### **1.2.2 – Progression de la lésion d'athérosclérose (lésions de types III et IV)**

La mort cellulaire peut être provoquée par deux mécanismes différents, la nécrose et l'apoptose. La nécrose est la conséquence d'une lésion accidentelle qui aboutit à la lyse cellulaire. L'apoptose désigne la mort cellulaire active ou « suicide » cellulaire survenant au cours de remodelage normal ou pathologique des tissus. Les lipides toxiques (lipides et lipoprotéines oxydées) activent la voie mitochondriale de l'apoptose. L'apoptose des cellules spumeuses peut participer à la genèse du centre nécrotique caractéristique des plaques avancées. Dans les conditions physiologiques, les cellules et les corps apoptotiques sont rapidement épurés par les phagocytes tissulaires et ne provoquent pas de réponse inflammatoire. Dans la plaque d'athérome cette épuration semble ralentie. Le rôle de l'apoptose dans les phénomènes inflammatoires de la plaque est ambivalent, car elle peut réduire les phénomènes inflammatoires en diminuant le nombre des cellules pro-inflammatoires (macrophages, lymphocytes), mais l'excès local de métabolites non

dégradables (cholestérol, oxystérols) et la compétition entre la captation des Ox-LDL avec des fragments cellulaires apoptotiques peut augmenter l'accumulation de matériel potentiellement pro-inflammatoire (lipides). La mort des cellules spumeuses entraîne l'accumulation de lipides extracellulaires en faible quantité, sans formation de véritable centre lipidique. Il s'agit de lésions du type III qui surviennent après 20 ans sans provoquer d'événements cliniques. L'accumulation focale de lipides extracellulaires, sous les cellules spumeuses correspond au type IV. Ce centre lipidique constitue une zone de faible densité cellulaire, avec des cristaux de cholestérol et quelques macrophages, dont des cellules géantes. Cet ensemble lésionnel n'est pas entouré par une réaction fibreuse. Ces lésions apparaissent après 15 ans et surtout après 40 ans. Ces lésions peuvent être le siège d'événements thrombotiques et éventuellement symptomatiques [12,13].

### **1.2.3 – La plaque d'athérosclérose mature (type V)**

La plaque se développe longtemps sans altérer le calibre vasculaire, car le vaisseau s'adapte par un élargissement compensatoire dénommé remodelage vasculaire. Lorsque la masse intimale excède 40% de la surface totale de la paroi, le remodelage excentrique de la paroi n'est plus suffisant pour contenir la plaque et son développement progresse vers la lumière intimale en provoquant une sténose. Il s'agit de la lésion typique d'athérosclérose fibrolipidique (type V), telle qu'elle est décrite par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle est observée chez la majorité des individus après 40 ans et peut engendrer des manifestations cliniques. Cette plaque comprend un centre lipidique entouré d'une chape fibreuse. Le centre lipidique est constitué de cellules parfois nécrotiques, et de lipides extracellulaires sous forme de cristaux de cholestérol, d'esters de cholestérol, et de phospholipides. Les cellules du centre sont essentiellement des macrophages spumeux et des cellules géantes (70 %), mais correspondent également à des cellules musculaires lisses. La



chape fibreuse qui entoure le centre est constituée d'une matrice qui contient des fibres de collagène de type I et III, des glycoprotéines, dont la fibronectine, des glycosaminoglycanes et particulièrement des chondroïnes sulfate. Les cellules contenues dans la chape fibreuse sont essentiellement des cellules musculaires lisses (70 %), le reste étant constitué de macrophages et de cellules inflammatoires; il existe également des lymphocytes T (10 %). Enfin les cellules endothéliales entourent la lésion en formant un revêtement continu thromborésistant, dont la persistance et l'intégralité fonctionnelle assurent l'absence de complication de la plaque. Il existe selon la classification de l'AHA trois sous-types V:

- type Va, plaque fibrolipidique;
- type Vb, présence de calcifications;
- type Vc, plaque fibreuse caractérisée par l'absence de centre lipidique.

Les cellules musculaires lisses de la chape proviennent de cellules ayant migré à partir de la média à travers la limitante élastique interne et proliféré dans l'intima. Des facteurs chimiotactiques libérés par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses (bFGF, PDGF-BB, VEGF) ou des cytokines (TNFalpha) induisent la migration des cellules de la média ou de l'adventice. Les fragments de collagène fibrillaire ou d'élastine produit par protéolyse sont également des facteurs chimiotactiques pour les cellules musculaires lisses. Les cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes), mais aussi les cellules musculaires lisses activées sécrètent des métalloprotéases (MMP) qui dégradent quasiment tous les composants de la matrice extracellulaire et facilitent la migration des cellules musculaires lisses vers l'intima. Les cytokines IL1 et TNFalpha sécrétées par les lymphocytes T induisent l'expression par les cellules musculaires lisses de métalloprotéases. Ces cytokines activent l'expression de MMP-2 exprimée de façon constitutive par les cellules musculaires lisses et induisent l'expression d'autres collagénases (MMP-1, MMP-9 et MMP-3), ainsi que de MMP-3 (stromélysine) qui

dégradent les protéoglycanes et l'élastine. L'activité des MMP est inhibée par des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP-1, 2, 3) produits par les macrophages et les cellules musculaires lisses.

Par une action de type paracrine les cellules endothéliales et les macrophages sécrètent le PDGF et provoquent la prolifération des cellules musculaires lisses, puis par une action autocrine les cellules musculaires lisses sécrètent ce facteur qui provoque leur prolifération. Il existe d'autres facteurs de croissance, en particulier l'IGF-1, le TGF-bêta1.

Les cellules musculaires lisses sécrètent une matrice extracellulaire constituée principalement de collagène, de protéoglycanes, d'élastine et de glycoprotéines [12].

#### **1.2.4 – Plaques d'athérosclérose compliquées ou à risque (type VI)**

La plaque de type V peut subir des modifications la transformant en plaque compliquée, ou de type VI qui survient habituellement après 40 ans. Elle présente des phénomènes hémorragiques ou thrombotiques intraplaques. La cicatrisation qui survient après l'hémorragie et la formation du thrombus intraplaque contribuent à augmenter la sténose par augmentation de volume de la plaque. Ces hémorragies et thromboses peuvent rendre une plaque brutalement symptomatique et déclencher les accidents vasculaires aigus (angor instable, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral).

La classification de l'AHA reconnaît trois sous-types de type VI:

- type VIa (ulcération), rupture de la plaque caractérisée par une perte de substance à sa surface, il existe une ulcération macroscopique, microscopique ou une simple érosion de l'endothélium;
- type VIb (hémorragie ou hématome intraplaque), qui provoque une augmentation rapide du volume de la plaque et induit sa progression (augmentation de la synthèse de collagène, etc.);

- type VIc (thrombose), complication majeure de l'athérosclérose qui survient à la suite d'une rupture de plaque (60 % des cas) ou d'une érosion (40 % des cas).

La thrombose peut-être occlusive ou pariétale non occlusive. Le matériel lipidique thrombogène de la plaque est exposé au sang circulant. Une plaque est dite instable ou vulnérable lorsqu'elle est susceptible de subir une rupture ou une érosion. Un centre lipidique important diminue la résistance physique de la plaque, d'autant plus que les macrophages qui s'y trouvent sécrètent les MMP capables de dégrader la chape fibreuse et de diminuer davantage la résistance physique de la plaque. A ces facteurs constitutifs de la plaque s'ajoutent des contraintes mécaniques (forces s'exerçant sur la circonférence de la paroi et forces de cisaillement). La thrombose sur rupture de plaque s'observe lorsque le noyau lipidique occupe plus de 40 % du volume de la plaque et lorsque la chape fibreuse est fine et riche en macrophages et pauvre en cellules musculaires lisses.

Les zones de rupture sont caractérisées par la présence de cellules inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent l'activité des MMP par les cellules musculaires lisses et les macrophages. Les MMP digèrent la matrice extracellulaire et favorisent la rupture de plaque. La réponse inflammatoire est modulée par des cytokines dites antiinflammatoires. Ce sont l'IL10, le TGF-bêta et l'IL18BP (inhibiteur endogène de l'IL8). Les cytokines proinflammatoires déclenchent l'apoptose des cellules de la paroi vasculaire; de plus les cellules apoptotiques peuvent subir des modifications de types nécrotiques. La mort des cellules de la paroi vasculaire fragilise la plaque et augmente les risques de rupture.

Les cytokines pro-inflammatoires interviennent dans les complications athéromotiques de l'athérosclérose. Le facteur tissulaire est l'initiateur de la coagulation. Le gène du facteur tissulaire peut être activé dans les macrophages et les cellules musculaires lisses sous l'action de médiateurs ou de produits de l'inflammation et des Ox-LDL. L'apoptose joue un rôle fondamental en tant que catalyseur de la réaction thrombogène en

augmentant l'activité procoagulante du facteur tissulaire exprimé dans la plaque. Ce facteur détermine la thrombogénicité des plaques d'athérome. La coagulation est initiée après la lésion vasculaire et l'extériorisation des molécules de facteur tissulaire à la surface de la média, de l'adventice et de l'endothélium altéré.

L'IL1 et le TNFalpha modifient les propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales en diminuant la production de l'activateur du plasminogène de type cellulaire et en augmentant la production de l'inhibiteur du tPA, le PAI-1.

L'érosion superficielle de l'endothélium d'une plaque fibreuse est aussi un facteur important prédisposant à la thrombose. Les propriétés proadhésives et pro-coagulantes des cellules endothéliales pourraient être responsables de la formation de thrombi à la surface de ces cellules qui sont responsables de la survenue d'accidents vasculaires aigus [13].

Ainsi, l'inflammation au sein de la plaque apparaît comme un phénomène auto-entretenu qui conduit à l'augmentation du volume de la plaque et à son évolution vers les complications ou la stabilisation. Cette approche nouvelle de la physiopathologie de la plaque d'athérome ouvre la voie à la recherche de nouveaux marqueurs d'instabilité de la plaque et à de nouvelles thérapeutiques potentielles [14].

### **1.3 – Rôle de l'imagerie non invasive in vivo**

L'évaluation du risque de survenue d'événements cardiovasculaire a fait l'objet de plusieurs approches. A côté des marqueurs cliniques (FDRCV classiques: âge, sexe, antécédents familiaux, dyslipidémie, diabète, tabac, hypertension artérielle, obésité, sédentarité) et biologiques (taux sanguin de leucocytes, monocytes, fibrinogène, et protéine C-réactive ou CRP) classiques, le développement de l'imagerie a permis de mettre en évidence de nombreux marqueurs radiologiques indépendants de risque cardiovasculaire:

ceux visant à détecter la maladie athéromateuse générale, ceux visant à analyser le degré de sténose, et ceux visant à évaluer directement la plaque d'athérosclérose.

### **1.3.1 – Détection de la maladie athéromateuse « générale »**

De nombreux marqueurs radiologiques non liés à la visualisation de la plaque ont été développés: la mesure de l'épaisseur intima-média carotidienne (EIMc) et le score calcique coronaire sont ceux que nous décrivons en rapport avec notre travail de thèse. Il en existent d'autres tels que l'étude de la rigidité artérielle, de la dysfonction endothéliale ou de l'hypertrophie ventriculaire gauche [15].

#### **1.3.1.1 – Epaisseur intima-média carotidienne**

Depuis son introduction dans les années 90, l'EIMc a été largement utilisée comme un marqueur de maladie athéroscléreuse. L'EIMc peut être mesurée de manière non invasive par échographie haute résolution en mode B (sonde haute fréquence: 7.5-10 MHz). Il s'agit de la distance entre l'interface sang/paroi, ligne hyper-échogène correspondant à l'intima, et l'interface média/adventice elle aussi hyper-échogène [16]. Deux approches sont utilisées: 1) mesures multiples de l'EIMc au niveau de la paroi antérieure et postérieure des trois segments principaux des artères carotides (artère carotide commune, bifurcation carotidienne et artère carotide interne); et 2) mesure automatique informatisée de l'EIMc, restreinte à la paroi postérieure de la distalité de l'artère carotide commune. Cette dernière technique est supérieure en terme de précision et de reproductibilité, avec une différence d'environ 3% entre deux mesures successives [17]. En conséquence, la mesure de l'EIMc au niveau de l'artère carotide commune est devenue un outil validé pour les études multicentriques à grande échelle. Cependant, l'artère carotide commune a moins de probabilité de présenter des plaques significatives que la bifurcation carotidienne et l'artère carotide interne.

La mesure de l'EIMc en échographie est particulièrement intéressante car elle représente un facteur de risque indépendant d'événements cardiovasculaires [18-20]. Hollander et al. [21] ont montré, dans une étude rétrospective incluant 3 996 patients sans antécédents d'AVC, suivis sur une durée moyenne de 6.1 ans, une augmentation du risque d'AVC avec un risque relatif de 2.23 (95% intervalle de confiance ou IC: 1.48-3.36) entre le premier et le troisième tertile de la mesure de l'EIMc (< 0.72 mm et > 0.84 mm). De même, O'Leary et al. [19] retrouvaient, dans une étude réalisée chez 5 858 sujets âgés de 65 ans et plus, avec un suivi médian de 6.2 ans, un risque relatif d'AVC ou d'infarctus du myocarde de 3.87 (95% IC: 2.72-5.51) entre les quintiles les plus haut et les plus bas de la mesure de l'EIMc. En pratique, si au niveau individuel il est difficile d'établir une valeur seuil pathologique, une augmentation de l'EIMc est fortement associée au risque de survenue d'un accident thrombo-embolique que ce soit dans le territoire carotidien ou non.

#### **1.3.1.2 – Score calcique coronaire**

Le scanner coronaire permet d'apprécier le degré de calcification des artères coronaires, lui-même corrélé à l'extension de la maladie coronaire. La plaque d'athérosclérose évolue en plusieurs phases et la calcification de la paroi correspond à un stade avancé, et donc plus stable, de la maladie athéromateuse [22]. De fait, il n'y a pas de relation entre l'existence d'une calcification coronaire et le caractère instable d'une plaque. De même, la détection des plaques calcifiées ne permet pas de localiser une lésion sténosante. Le SCC authentifie la présence de plaques calcifiées qui constituent le terrain révélateur de l'existence de plaques plus jeunes et plus instables, mais qui ne se situent pas forcément dans le même territoire. Les patients présentant des plaques calcifiées sont aussi ceux qui ont le plus de risque de présenter des plaques non calcifiées ou molles, à haut risque de rupture. Le calcul du SCC ou score d'Agatston est basé sur le coefficient d'atténuation exprimé en unités Hounsfield et de la

surface calcifiée détectée. Il permet d'évaluer le risque global d'événements cardiovasculaires du patient asymptomatique et d'estimer le risque de coronaropathie chez le patient avec douleur atypique, en raison de sa forte association statistique avec le volume d'athérosclérose coronaire.

Dans une méta-analyse récente [22], les risques relatifs d'événements cardiovasculaires de 27 622 patients ont été rapportés en fonction de leurs SCC. Cette analyse montrait que les patients sans calcification détectable (score calcique = 0) sont des patients à bas risque d'événement cardiovasculaire grave (décès ou infarctus 0.4% sur 3-5 ans). Chez les patients avec calcifications coronaires, le risque relatif (RR) d'événements cardiovasculaires croît en fonction de la sévérité du score calcique : score 1 à 112 (RR = 1.9, 95% IC: 1.3-2.8,  $p < 0.01$ ), score 100 à 400 (RR = 4.3, 95% IC: 3.1-6.1,  $p < 0.0001$ ), score 400 à 1000 (RR = 7.2, 95% IC: 5.2-9.9,  $p < 0.0001$ ) et score > 1000 (RR = 10.8, 95% IC: 4.2-27.7,  $p < 0.0001$ ). Par ailleurs, la prévalence des calcifications coronaires est plus élevée chez l'homme et augmente avec l'âge [23]. Elle varie aussi selon l'origine ethnique des patients, avec une prévalence plus élevée chez les caucasiens [24].

La mesure du SCC offre donc un double intérêt : pronostique en permettant d'estimer le RCV du patient, mais également diagnostique dans la recherche d'une ischémie myocardique silencieuse.

### **1.3.2 – Analyse du degré de sténose**

L'imagerie de l'athérosclérose a longtemps reposé quasi exclusivement sur la mesure du degré de sténose vasculaire entraîné par la plaque, que ce soit par angiographie, échographie-Doppler, angio-scanner ou angio-IRM. En pratique quotidienne, le degré de sténose entraîné par la plaque reste encore actuellement un critère majeur de prédiction de l'instabilité de la plaque et donc du choix thérapeutique. Plusieurs grandes études, notamment

en pathologie carotidienne, ont montré la corrélation entre degré de sténose et risque de survenue d'un accident thrombo-embolique [25-27]. Cependant, la sténose qui, du fait de son retentissement hémodynamique, va être à l'origine des manifestations cliniques chroniques de l'athérosclérose, ne représente que l'empreinte sur la lumière de la structure anatomopathologique complexe qu'est la plaque. D'autre part, la mesure du degré de sténose ne prend pas en compte l'existence du remodelage positif qui correspond à la croissance centrifuge de la plaque permettant de limiter, au moins au début de son évolution, l'influence de la plaque sur la réduction du chenal circulant [28]. La prise en considération du degré de sténose seul tend donc à sous-estimer l'importance réelle de la plaque. Enfin, il ne prend pas en compte le risque de survenue de rupture sur les plaques non responsables de sténose significative [29]. L'ensemble de ces éléments a conduit à rechercher de nouvelles techniques pour analyser plus directement la plaque.

### **1.3.3 – Imagerie haute résolution de la plaque d'athérosclérose**

L'amélioration de la résolution des différentes modalités d'imagerie non invasive et l'apparition de matériel dédié permettent une analyse directe de la plaque et de ses différents composants à la recherche de critères locaux d'instabilité.

#### **1.3.3.1 – Scanner multibarrettes**

Le scanner coronaire multibarrettes s'est récemment imposé dans l'arsenal des techniques d'imagerie comme une méthode fiable, rapide et peu invasive de détection de la maladie coronaire athéromateuse. Les nombreuses études comparant le scanner et la coronarographie conventionnelle retrouvent une très bonne sensibilité et une excellente spécificité du scanner à détecter des lésions coronaires significatives [30]. Par ailleurs, le scanner coronaire démontre une excellente valeur prédictive négative voisine de 100%, ce qui



signifie que devant un scanner coronaire de bonne qualité ne mettant pas en évidence de sténose coronaire, la probabilité d'une authentique maladie coronaire significative non vue est très faible, permettant alors de déterminer rapidement et sans coronarographie des patients indemnes de sténose coronaire.

L'amélioration constante des résolutions spatiale et temporelle du scanner par l'accroissement du nombre d'acquisitions parallèles (barrettes) et de leur vitesse de rotation permet non seulement d'estimer de mieux en mieux le calibre de la lumière artérielle mais aussi de détecter la présence de plaques d'athérosclérose coronaires et d'analyser leur morphologie ainsi que leur densité. Une étude récente a montré que le volume des plaques d'athérosclérose coronaires mesuré par scanner 64-coupes est corrélé avec les mesures réalisées par échographie endocoronaire [31]. Le scanner permet aussi de détecter la présence d'un remodelage positif (vers l'extérieur de la paroi artérielle) des plaques d'athérosclérose, qui est un des nombreux marqueurs de plaques vulnérables. Malheureusement, l'étude de la composition des plaques d'athérosclérose coronaires par le scanner est plus difficile. L'analyse de la densité des plaques d'athérosclérose avec le scanner permettrait de détecter la présence d'un volumineux noyau lipidique de densité plus faible que le tissu fibreux (plaques « hypodenses ») [32]. Cependant, la densité des plaques d'athérosclérose semble être en partie liée à la quantité d'agent de contraste présente dans la lumière artérielle, ce qui limite la reproductibilité des mesures et rend difficile la définition de critères de vulnérabilité de la plaque, en tout cas à l'étage coronarien. Cette analyse semble beaucoup plus accessible à l'étage carotidien compte tenu du calibre de l'artère. Récemment, Serfaty et al. [33], dans l'étude Carmedas, ont montré une relation entre densité de plaque carotidienne basse (c'est-à-dire plaque non calcifiée) et survenue d'événements neurologiques, confirmant la possibilité offerte par le scanner d'identifier des facteurs d'instabilité. Cependant, l'identification précise des composants de la plaque, notamment la différenciation entre lipides et fibrose, comme à

l'étage coronarien, est rendue difficile par les phénomènes de volume partiel liés à la petite taille des structures explorées [34,35].

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous sommes notamment proposé de réaliser une évaluation de la performance du scanner multibarrettes multi-sites (cœur et artères coronaires, troncs artériels supra-aortiques, et vaisseaux artériels intracrâniens) en un seul temps, en regard des techniques de référence que sont l'échocardiographie transthoracique et/ou transoesophagienne, l'échographie-Doppler des troncs supra-aortiques (TSA), et l'angio-IRM des TSA et des artères intracrâniennes, dans la conduite du bilan étiologique des infarctus cérébraux. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans « *Radiology* » (Annexe A) [36].

### **1.3.3.2 – IRM haute résolution**

L'IRM multi-contraste, en analysant la plaque d'athérosclérose avec différentes séquences IRM, permet de déterminer sa composition en lipides et en eau. Elle constitue donc une technique d'imagerie non invasive prometteuse pour détecter un certain nombre de critères morphologiques caractéristiques des plaques d'athérosclérose vulnérables ou instables: chape fibreuse fine ou rompue, présence d'un volumineux cœur lipidique, d'ulcération, d'hémorragie intra-plaque, de matrice lâche et de calcifications. Des études récentes d'imagerie des artères carotides ont montré une bonne corrélation entre l'IRM de ces plaques et les données histologiques [37], ainsi qu'une diminution du contenu lipidique des plaques sous statines [38]. Malgré des progrès constants, cette technique nécessite toujours des temps d'acquisition prolongés et son utilisation pour l'imagerie des plaques d'athérosclérose coronaires reste limitée par les mouvements respiratoires et cardiaques, et le calibre des artères étudiées.

En plus de l'amélioration des séquences IRM (T1, densité de proton ou DP, T2, et time of flight ou TOF) permettant l'analyse des critères morphologiques de vulnérabilité de la plaque dont les aspects sont largement décrits dans la littérature, des agents de contraste IRM ciblant des molécules ou des cellules propres aux plaques vulnérables sont développés pour associer à une imagerie « anatomique » l'identification des activités biologiques et notamment de la composante inflammatoire de la plaque avec une haute résolution spatiale. Une première classe d'agents de contraste génériques pour l'IRM est basée sur des molécules paramagnétiques telles que le gadolinium. L'accumulation de molécules de gadolinium dans un tissu raccourcit le temps de relaxation T1 des protons et donc augmente le signal IRM sur des séquences pondérées en T1. La spécificité de ces agents de contraste est obtenue en liant une ou plusieurs molécules de gadolinium à un ligand ayant une forte affinité pour une activité biologique ou un type cellulaire marqueurs de vulnérabilité. L'agent de contraste se lie ainsi à son récepteur et entraîne une augmentation de l'intensité du signal IRM dans les régions vulnérables de la plaque. Certaines molécules appartenant à cette génération d'agents de contraste sont actuellement testées pour la détection de l'activité protéolytique ou de thrombus utilisant un ligand ciblant des enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire, ou la fibrine [39], respectivement.

L'étude de la prise de contraste de gadolinium par la plaque d'athérosclérose pour la mise en évidence de la composante inflammatoire de celle-ci est la technique qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux. La prise de contraste de la plaque après injection intraveineuse de gadolinium correspond à deux phénomènes: l'augmentation de la perméabilité de la paroi et la néo-vascularisation [40,41]. Deux types d'approche peuvent être utilisées: soit une imagerie statique, réalisée à un délai fixe après l'injection de contraste, présentant l'avantage d'une bonne résolution spatiale [42,43], soit une imagerie dynamique, avec une résolution spatiale moindre mais prenant en compte l'évolution de la prise de contraste dans le

temps [44]. La grande majorité des travaux publiés utilisent une séquence de type Turbo Spin Echo (TSE) pondérée T1 avec Black Blood (par DIR ou double inversion-récupération) et saturation de la graisse (DIR-TSE). Cette séquence a l'avantage d'un bon rapport signal et contraste sur bruit avec des temps d'acquisition raisonnables (de l'ordre de 60 secondes par coupe). Par contre, l'utilisation de la synchronisation à l'électrocardiogramme (ECG) pose problème car elle fixe le temps de répétition (TR) de la séquence à au moins un intervalle RR, ce qui, chez un patient présentant un rythme de 60 battements par minute, impose un TR minimal de 1000 ms. Or, un tel TR apparaît non optimal pour une pondération T1 correcte des images. L'attitude commune consiste donc soit à supprimer la synchronisation ECG (avec possibilité de flou cinétique lié aux mouvements de la paroi artérielle) [40,43], soit à garder la synchronisation ECG au détriment de la pondération T1 [42]. Pour contourner ce problème, nous avons choisi d'ajouter, à la séquence 2D TSE avec double inversion-récupération et synchronisation ECG, un pulse de 90° entre le module de double inversion-récupération et le module de lecture TSE de façon à rendre le TR de la séquence plus court. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans « *Journal of Magnetic Resonance Imaging* » (Annexe B) [45].

Une autre classe d'agents de contraste IRM est basée sur des molécules superparamagnétiques telles que des nanoparticules de fer. Ces particules de fer, à forte concentration, entraînent des perturbations du champ magnétique détectables en IRM sous la forme d'artéfacts noirs, ou effet T2\*. Une importante infiltration par des macrophages est fréquemment retrouvée dans la chape fibreuse et le cœur lipidique des plaques vulnérables. Les macrophages pourraient favoriser la rupture des plaques d'athérosclérose en sécrétant des enzymes protéolytiques et accélérer la formation d'un thrombus en déposant dans les plaques des molécules pro-coagulantes. Les USPIO (ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide) sont des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de sucres mesurant environ 20 nm

de diamètre et captées de façon préférentielle par les macrophages. Les USPIO, après une injection intra-veineuse, se concentrent dans les régions riches en macrophages et permettent de détecter des plaques d'athérosclérose riches en macrophages dans l'aorte chez le lapin hypercholestérolémique [46] et dans les artères carotides chez l'homme [47]. Malheureusement, le meilleur délai pour la détection des USPIO dans les plaques d'athérosclérose en IRM est de 36 heures après l'injection, ce qui limite clairement leur utilisation en clinique.

Le développement de ces agents de contraste pourrait à terme permettre d'obtenir avec l'IRM une imagerie « moléculaire » de la plaque d'athérosclérose avec une résolution spatiale supérieure à celles de la médecine nucléaire et sans nécessité d'irradiation.

## **2 – Protocole COCASE**

Ci-dessous un descriptif détaillé du protocole COCASE qui a donné lieu à une publication internationale sur le thème « Imagerie de l'athérosclérose chez le sujet non diabétique » (Annexe A).

### **2.1 – Titre**

Intitulé du protocole : étude COCASE ou « COeur, CARotides, Scanner multi-barrettes, Etiologie des infarctus cérébraux » (ou évaluation du scanner multibarrettes dans le bilan étiologique des AVC ischémiques en phase aigue).

### **2.2 – Promoteur**

Hospices Civils de Lyon, Direction de la Recherche, 3 quai des Célestins, 69229 Lyon Cedex.

## **2.3 – Investigateur principal**

Monsieur le Professeur Philippe DOUEK; Service de Radiologie, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, CREATIS-LRMN, UMR CNRS 5515, INSERM U630, 28 avenue du Doyen Lépine, 69394 Bron Cedex; Tél: 04.72.35.73.53; Fax: 04.72.35.72.91; E-mail: philippe.douek@creatis.univ-lyon1.fr.

## **2.4 – Contexte scientifique**

### **2.4.1 – Généralités**

L'AVC est un enjeu de santé public majeur, première source de handicap acquis, deuxième cause de démence, troisième cause de mortalité dans les pays développés. La prévention optimale des récurrences, dont le risque est estimé à 30% à 5 ans [48], est un enjeu majeur. Les accidents ischémiques cérébraux d'origine athérombotique ou cardioembolique représentent 60% des événements. Une expertise étiologique précise et rapide est donc indispensable afin d'instituer le traitement préventif le mieux adapté [49]. Cette expertise repose actuellement sur la réalisation d'un ensemble d'examen para-cliniques: biologie, ECG, échocardiographie réalisée par voie transthoracique et/ou transoesophagienne, examen des TSA (Doppler, angio-scanner, angio-IRM) et des artères intracrâniennes (angio-IRM). La réalisation de l'ensemble des examens morphologiques à visée cardiaque ou artérielle est de nature à majorer le coût de l'accident, accroître la durée de séjour, et retarder la mise en place d'une prévention optimale. Dans ce contexte l'intérêt du scanner multibarrettes reste à préciser en regard des examens de référence. Le scanner multibarrettes permet une acquisition en un seul temps d'un volume s'étendant du crâne au cœur. Les cavités cardiaques, les TSA, le polygone de Willis et ses branches et l'encéphale peuvent être étudiés en un même temps. Cet examen peut donc simplifier l'approche

étiologique. Nous proposons de réaliser une évaluation de la performance du scanner multibarrettes, en regard des techniques de référence dans la conduite du bilan étiologique des infarctus cérébraux.

#### **2.4.2 – Epidémiologie des AVC ischémiques**

Environ 170 000 AVC ont été recensés par le Programme de Médicalisation des systèmes d'Information (PMSI) en 1999 en France. Classiquement, 85% sont ischémiques, ce qui représente environ 144 000 cas en un an [48]. La mortalité au cours du premier mois après un infarctus cérébral a été évaluée à 13% [49]. L'AVC ischémique est dominé par 3 types d'étiologies: l'athérosclérose des grosses artères (ou macroathérome), l'athérome des petites artères (moins de 500 microns de diamètre) ou microathérome, et les causes cardioemboliques [48]. La fréquence relative des différentes étiologies varie selon les études et les critères de diagnostic utilisés pour la classification. L'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) indique les chiffres suivants: macroathérome dans environ 30% des cas, lipohyalinose des petites artères dans environ 20% des cas, cardiopathies emboligènes dans environ 20% des cas. Dans 30% des cas, une étiologie précise ne peut être documentée, en raison de la négativité des examens ou en présence de causes concomitantes [48].

Le risque de récurrence, en particulier précoce dans le premier mois, est influencé par la cause de l'AVC [48]. De même, le traitement préventif le mieux adapté est dicté par l'étiologie [50]. Les accidents liés à un athérome des gros troncs artériels s'accompagnent du risque de récurrence le plus élevé, en particulier au cours de la première semaine d'après les études épidémiologiques [50]. Les explorations étiologiques doivent donc être réalisées le plus rapidement possible, dans les 48 heures selon les recommandations de l'ANAES [48], en particulier l'exploration des TSA.

### **2.4.3 – Conduite habituelle du bilan étiologique d'un infarctus artériel cérébral**

L'analyse étiologique d'un infarctus cérébral repose sur un ensemble d'explorations paracliniques comportant des examens morphologiques cardiovasculaires, des examens biologiques et électrocardiographiques.

L'examen morphologique de l'arbre artériel à destinée encéphalique repose habituellement sur l'échographie-Doppler des TSA, et/ou l'angio-IRM, et/ou l'angioscanner. On prescrit habituellement un de ces 3 examens en fonction des disponibilités (en pratique habituelle l'écho-Doppler des TSA). En cas d'anomalie ou de doute sur le premier examen, on complète le bilan par une deuxième méthode. La fiabilité de ce couple d'examens est démontrée dans l'appréciation d'une sténose carotidienne athéromateuse et la prise de décision chirurgicale [49,51]. En effet, les études européenne ECST (European Carotid Surgery Trial) et américaine NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) ont montré, chez les patients symptomatiques, une amélioration très importante du pronostic en cas d'intervention chirurgicale systématique sur les sténoses athéromateuses  $\geq 70\%$  et de non intervention sur les sténoses inférieures à  $50\%$  [51,52]. L'écho-Doppler, méthode non invasive, permet une estimation correcte du degré de sténose et a l'avantage essentiel d'apprécier la structure de la paroi artérielle et de la plaque d'athérome. Cette méthode souffre d'une exploration limitée en particulier des siphons carotidiens et des artères intracrâniennes et présente un caractère opérateur dépendant [53].

L'angio-IRM artérielle est une méthode non invasive fiable d'exploration du polygone de Willis et de ses branches, dont l'examen morphologique échappe largement à l'échographie. A ce titre, cet examen est régulièrement utilisé dans le bilan étiologique des AVC ischémiques.



L'échocardiographie permet de visualiser une cause cardioembolique, justifiant la prescription d'anticoagulants, en phase aiguë et/ou au long cours. L'échocardiographie par voie transoesophagienne (ETO) améliore les informations anatomiques, améliore la détection de thrombus, permet le diagnostic d'anomalies du septum interauriculaire, considérées comme des cardiopathies emboligènes mineures. L'ETO est actuellement une méthode de référence dans l'appréciation de l'athérome de la crosse aortique, source d'accident ischémique [26]. En revanche, cet examen ne permet pas d'examiner correctement la partie initiale de l'arche aortique, avant la naissance des TSA, et peut ainsi méconnaître des lésions potentiellement emboligènes. Cette portion de l'aorte est mieux explorée par le scanner cardiaque, souvent utilisé pour confirmer et compléter les données de l'ETO.

#### **2.4.4 – Place actuelle du scanner dans les explorations cardiaques et des**

##### **TSA: bénéfice direct lié à l'utilisation du scanner multibarrettes**

Le scanner à rayons X est un examen fiable dans l'exploration morphologique des cavités cardiaques et de l'aorte, ainsi que des TSA comme évoqué précédemment. Il permet une visualisation de l'ensemble de l'aorte y compris dans sa portion initiale, qui échappe classiquement à l'ETO. Il est couramment utilisé en cardiologie pour la pathologie aortique. L'angioscanner cérébral est également une technique fiable, de sensibilité comparable à l'IRM. L'utilisation du scanner dans le bilan étiologique des AVC a jusqu'à présent été limitée en raison des contraintes techniques et de la nécessité d'une injection de produit de contraste iodé. En effet, la nécessité d'explorations morphologiques multiples (angiographie cérébrale, angiographie des TSA, examen cardiaque) n'autorise pas d'exploration scanographique à chacun de ces étages compte tenu de la nécessité d'une injection à chaque examen. On a donc privilégié jusqu'à présent des explorations multiples (écho-Doppler, ETO, angio-IRM) mais sans injection d'iode. Le perfectionnement des scanners, en particulier la

technologie multibarrettes, peut faire rediscuter cette stratégie. En effet, il est désormais possible de réaliser une acquisition de grand volume, intéressant l'ensemble des régions anatomiques ciblées dans le bilan étiologique d'AVC ischémiques, et de limiter l'injection de produit de contraste iodé.

La multiplication des examens est source de retard au diagnostic étiologique, préjudiciable au patient. L'examen scanner multibarrettes permet d'étudier plus rapidement, en un seul temps, les TSA et le polygone de Willis et ses branches, ce qui constitue un bénéfice direct pour les patients inclus dans ce protocole. Si une étiologie est déterminée au scanner, la prise en charge diagnostique et thérapeutique habituelle est accélérée. D'autre part, à l'étage thoracique, le scanner multibarrettes permet de visualiser certaines lésions aortiques échappant à l'échographie (partie initiale de la crosse aortique), ce qui représente également un avantage pour les patients inclus dans le protocole. Les risques liés à la participation au protocole sont essentiellement ceux d'un scanner avec injection de produit de contraste, examen largement répandu en routine clinique. Compte tenu des avantages cités plus haut en cas de réalisation du scanner multibarrettes, le rapport bénéfices/risques apparaît favorable.

## **2.5 – Objectifs**

### **2.5.1 – Hypothèses de recherche**

Le scanner multibarrettes pourrait permettre de simplifier le bilan étiologique des AVC ischémiques en phase aigue, en permettant une acquisition en un seul temps d'un volume s'étendant du crâne au cœur. Il aurait son intérêt en première intention. Des examens complémentaires ne seraient demandés que s'il ne permet pas un diagnostic étiologique ou pour préciser le diagnostic étiologique.

### **2.5.2 – Objectif principal**

Evaluation des performances diagnostiques du scanner multibarrettes dans la détection des anomalies morphologiques (capacité à déterminer l'étiologie de l'AVC) en comparaison aux méthodes de référence (batterie de tests) dans le cadre du bilan étiologique de l'AVC en phase aiguë. Les méthodes de référence sont représentées par :

- l'échographie cardiaque transoesophagienne à la recherche d'une cardiopathie emboligène (séquelles d'infarctus du myocarde, thrombus intracardiaque, d'athérome aortique, anévrisme du septum interatrial - foramen ovale perméable, lésions valvulaires, endocardite, de tumeur intra-cardiaque, thrombose de valve mécanique, myocardiopathie dilatée);
- l'écho-Doppler des TSA et l'angio-IRM artérielle pour la recherche d'une lésion des TSA (athérome des TSA et intra-crânien, thrombus muraux, dissection des artères à destinée encéphalique).

### **2.5.3 – Objectifs secondaires**

- Explorer les performances diagnostiques du scanner multibarrettes dans la détection d'une étiologie de l'AVC en phase aiguë pour chaque étiologie;
- Comparaison des critères quantitatifs et catégoriques (degré de sténose artérielle en critères ECST et NASCET, sténoses classées en catégories < 50%, 50 à 70%, > 70%, > 90%, épaisseur de l'athérome aortique, taille d'un thrombus, d'une tumeur intra-cardiaque) entre le scanner multibarrettes et la batterie de tests;
- Tolérance biologique du scanner (insuffisance rénale recherchée par réalisation d'un ionogramme sanguin avec créatinémie le lendemain du scanner) et réactions allergiques constatées par le radiologue ou le neurologue après le scanner.

### **2.6 – Type d'étude**

Il s'agit d'une étude monocentrique prospective, exploratoire d'un test diagnostique sur une population donnée, avec bénéfice individuel direct potentiel lié à la réalisation plus rapide d'un bilan complet par rapport aux conditions actuelles, en particulier pour l'examen des TSA et le polygone de Willis, pour lesquels le scanner est une méthode éprouvée, et lié aussi à une meilleure exploration de la partie initiale de l'aorte par rapport à l'ETO. La durée de l'étude pour chaque patient s'étend de l'inclusion jusqu'à la date de réalisation du dernier examen du bilan étiologique morphologique. Il n'est pas prévu de suivi à distance. L'étude est conduite conformément aux lignes directives des Bonnes Pratiques Cliniques françaises et européennes et de la déclaration d'Helsinki, après avis du Comité Consultatif des Personnes se Prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB) et recueil d'un consentement libre et éclairé.

## **2.7 – Critères d'évaluation**

### **2.7.1 – Principaux**

Le critère de jugement principal est la capacité de chacun des tests à trouver une étiologie (sensibilité/spécificité): séquelles d'infarctus du myocarde, thrombus intra-cardiaque, athérome aortique, anévrisme du septum interatrial - foramen ovale perméable, lésions valvulaires, endocardite, tumeur intra-cardiaque, athérome des TSA et intra-crânien, thrombus muraux, dissection des artères à destinée encéphalique, lésions artérielles intra-crâniennes, thrombose de valve mécanique, myocardiopathie dilatée. L'intérêt du scanner multibarettes est qu'il puisse simplifier le bilan étiologique des AVC ischémiques en phase aigue, c'est-à-dire qu'il puisse à lui seul, en permettant une acquisition en un seul temps d'un volume s'étendant du crâne au cœur, permettre un diagnostic étiologique ou une orientation étiologique. L'intérêt principal est sa sensibilité/spécificité sur l'ensemble des étiologies potentielles d'un AVC ischémique en phase aigue. Le tableau ci-dessous présente les résultats attendus des différentes techniques face aux différentes étiologies:

		<b>Etiologies</b>				
		Séquelles infarctus du myocarde / Myocardiopathie dilatée	Thrombus intracardiaque / Thrombose de valve mécanique / Lésions valvulaires	Athérome aortique	Anévrisme du septum interatrial	Foramen ovale perméable
<b>Examens</b>	ETO	+	+	+	+	+
	Echo-Doppler des TSA	-	-	-	-	-
	Angio-IRM	-	-	-	-	-
	Scanner mutibarettes	+	+	+	+	+

		<b>Etiologies</b>				
		Athérome des troncs supra-aortiques et intracrâniens / Lésion artérielle intracrânienne	Thrombus muraux	Dissection des artères à destinée encéphalique	Endocardite	Tumeur intracardiaque
<b>Examens</b>	ETO	-	-	-	+	+
	Echo-Doppler des TSA	+	+	+	-	-
	Angio-IRM	+	+	+	-	-
	Scanner mutibarettes	+	+	+	+	+

### 2.7.2 – Secondaires

- Capacité du scanner multibarettes à détecter une étiologie lorsque la batterie de tests a permis un diagnostic étiologique (sensibilité/spécificité);
- Comparaison des critères quantitatifs et catégoriques (degré de sténose artérielle en critères ECST et NASCET, sténoses classées en catégories < 50%, 50 à 70%, > 70%, > 90%, taille d'un thrombus, d'une tumeur intra-cardiaque, épaisseur de l'athérome, plaques);

- Tolérance du scanner: réactions anaphylactoïdes (réactions allergiques constatées par le radiologue ou le neurologue après le scanner), insuffisance rénale (ionogramme sanguin avec créatinémie systématique le lendemain du scanner).

## **2.8 – Descriptif de la population étudiée**

### **2.8.1 – Sélection**

Un total de 100 patients sera inclus. Cette taille d'échantillon permettra d'affirmer que la sensibilité est d'au moins 61%, 72% ou 84% (bornes inférieures de l'intervalle de confiance) si la valeur observée de la sensibilité se situe respectivement à 70%, 80% ou 90%.

### **2.8.2 – Critères d'inclusion**

- Patients de 18 à 90 ans victimes d'un AVC ischémique ou d'un accident ischémique transitoire (AIT) récent (moins d'une semaine d'évolution), recrutés de manière prospective, à l'unité 201 (Hôpital Neurologique de Lyon);
- Patient ayant donné son consentement libre et éclairé par écrit. Si le patient n'est pas en état de donner son consentement, obtention du consentement de son représentant, ou d'un proche, ou de la personne de confiance désignée;
- Patient bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale;
- Absence de tous les critères de non inclusion.

### **2.8.3 – Critères d'exclusion**

- Contre-indication au scanner et à l'injection d'iode:
  - femme enceinte ou susceptible de l'être (absence de moyen de contraception efficace: pilule, stérilet, à demander à l'interrogatoire);
  - antécédents allergiques caractérisés, en particulier à un produit de contraste;

- antécédents d'asthme;
- insuffisance rénale avec créatinine sanguine supérieure à 130 micromoles/l au bilan d'entrée;
- clairance selon Cockcroft inférieure à 50 ml/min au bilan d'entrée;
- myélome connu;
- hyperthyroïdie connue non contrôlée.
- Difficultés d'acquisition synchronisée au rythme cardiaque: fibrillation auriculaire irrégulière et rapide (> 80 bpm);
- Contre-indication à l'ETO: suspicion de varices oesophagiennes, troubles de déglutition sévères, hypovigilance ou agitation sévère ne permettant pas la coopération du patient, dents mobiles, sténose oesophagienne connue;
- Contre-indication à l'IRM (claustrophobie, pace-maker, matériel métallique médical ou exogène non compatible, allergie connue au gadolinium);
- Refus ou retrait du consentement du patient ou de son entourage.

## **2.9 – Méthodologie**

### **2.9.1 – Déroulement pratique**

- Tous les patients inclus bénéficient des explorations suivantes: écho-Doppler des TSA, ETO, angio-IRM cérébrale, angio-IRM des TSA;
- L'imagerie cérébrale est réalisée dans les conditions habituelles du diagnostic d'urgence des AVC pris en charge à l'unité neurovasculaire. L'angio-IRM cérébrale et l'angio-IRM des TSA sont réalisées dans les délais et conditions habituels de fonctionnement de l'unité 201. L'ETO et l'écho-Doppler des TSA sont réalisés sur rendez-vous fixé par le secrétariat du service de radiologie concerné après transmission d'une demande écrite du neurologue;

- L'examen par scanner multibarrettes sera réalisé sur rendez-vous fixé après appel téléphonique et rédaction d'une demande écrite du neurologue investigateur (interprétation du scanner en double lecture);
- Saisie des données et contrôle de qualité de l'archivage par le neurologue en charge de l'étude, bénévolement;
- Centralisation de l'ensemble des images de scanner sur le système informatique (PACS);
- Data safety and monitoring board (DSMB): toute discordance de résultat entre le scanner et les examens de référence sera analysée en temps réel par le DSMB, comprenant les neurologues et radiologues en charge de l'étude. Le cas échéant, un nouvel examen sera proposé, parmi ceux déjà réalisés ou en dehors (par exemple angiographie conventionnelle en cas de discordance sur le degré d'une sténose carotide athéromateuse).

## **2.9.2 – Examens complémentaires**

### **2.9.2.1 – Scanner**

L'examen sera réalisé sur un scanner Brilliance 40 de Philips selon le protocole suivant:

- *Paramètres d'acquisition:*
  - collimation: 52x1.25 mm;
  - synchronisation cardiaque;
  - acquisition depuis le diaphragme jusqu'au polygone de Willis, soit environ 50 cm d'exploration (variable selon les individus);
  - épaisseur de coupe: 1.2 mm;



- kilovoltage: 120 kV;
- ampérage: 300 mAs/coupe;
- *Protocole d'injection:*
  - injection bi-phasique avec injecteur automatique 2 têtes comprenant successivement:
    - + une injection d'iode:
      - produit utilisé: Ioméron 400 (Bracco);
      - volume d'iode: 100 ml;
      - débit d'injection: 4 ml/s;
    - + un rinçage par solution saline:
      - volume d'iode: 50 ml;
      - débit d'injection: 4 ml/s.
- *Reconstruction multi-phases:*
  - deux phases du cycle cardiaque: 40 et 75%;
  - une phase globale (« UnTagged »).
- *Post-traitement:*
  - réalisé sur une station Philips WorkStation;
  - reconstructions MPR (Multi Planar Reconstruction) et MIP (Maximum Intensity Projection):
    - + des cavités cardiaques;
    - + de l'aorte thoracique;
    - + des artères carotides et vertébrales;
    - + du polygone de Willis.
- *Dose:*

- le CTDI<sub>w</sub> (weighted computed tomography dose index) est de 17.6 mGy. Pour une exploration moyenne de 50 cm, le DLP (produit dose-longueur) est de 980 mGy.cm. Les valeurs de CTDI et de DLP seront reportées pour chaque patient.

### **2.9.2.2 – Echo-Doppler des troncs supra-aortiques**

L'écho-Doppler sera réalisé sur un appareil haut de gamme avec des critères conformes aux recommandations établies dans la littérature [16,54]. Les paramètres techniques seront une fréquence d'émission de 5-10 MHz, une angulation Doppler < 60°, un volume d'échantillonnage > 5 mm. Les critères suivants de quantification des sténoses seront retenus:

- mesure des vitesses télé-systoliques et télé-diastoliques maxima au site le plus serré de la sténose;
- rapport carotidien des vitesses systoliques entre le site le plus serré de la sténose et l'artère carotide commune;
- rapport de diamètre en pourcentage entre la lumière artérielle totale en incidence transverse et la lumière résiduelle minima.

L'échographie-Doppler pulsé s'attachera par ailleurs à analyser la morphologie de la plaque: échogénicité (hypo ou hyperéchogène), surface (lisse ou irrégulière), texture. Le Doppler couleur sera utilisé dans ses modalités fréquence et amplitude (« puissance » ou « énergie ») avec une fréquence > 5 MHz et une profondeur d'exploration d'au moins 3 cm.

### **2.9.2.3 – Angio-IRM**

L'IRM utilisée est un équipement Siemens ou Philips à 1.5 Tesla. L'angio-IRM sera systématiquement couplée à une étude de l'encéphale. L'exploration comportera des séquences axiales pondérées en diffusion et en écho de gradient T2\* sur l'encéphale dans une

antenne « tête ». Cet examen pourra être complété par une analyse en perfusion. Une angio-IRM en temps de vol sera réalisée centrée sur le polygone de Willis avec analyse des partitions et reconstructions de type MIP. L'angio-IRM des TSA sera réalisée selon le protocole suivant:

- antenne « neck array »;
- séquence de repérage des carotides dans le champ d'exploration;
- détermination du temps de transit par:
  - soit une séquence de type « EG ultrarapide », monocoupe, répétée 25 fois après injection de 1ml de gadolinium 0.1 mmole/kg (test-bolus);
  - soit la technique de bolus tracking;
- séquence d'écho de gradient rapide pondérée en T1 en coronale centrée sur le cou, sans injection de gadolinium, avec une durée d'acquisition de 23 secondes:
  - 2 séquences d'écho de gradient rapide coronales, sans et avec injection par injecteur amagnétique de 0.1 mmol/kg de gadolinium correspondant à une dose standard;
  - soustraction des séquences sans et avec gadolinium et reconstructions MIP (16 angles de vue minimum sur 180°) complétées si besoin par des reconstructions MPR sur les bifurcations;
  - estimation du degré des sténoses (critère NASCET) [27].

#### **2.9.2.4 – Echographie transoesophagienne**

L'échographie cardiaque est réalisée sur un appareil Hewlett-Packard Sonos 5500 ou Acuson C512 équipés de sondes transthoraciques à 2.5 et 3.5 MHz et transoesophagiennes à 5 MHz. L'examen comporte une phase transthoracique précédant l'exploration par voie transoesophagienne. Il comporte l'injection d'une émulsion comportant 10cc de sérum physiologique et de 1cc d'air afin de détecter un shunt entre les cavités droites et gauches.

L'échocardiographie recherche une cause potentielle d'embolie cérébrale: thrombus intra-cardiaque, thrombose de valve mécanique, endocardite, contraste spontané, séquelles d'akinésie myocardique, cardiopathie dilatée, anévrisme du septum interauriculaire et/ou foramen ovale perméable, tumeur intra-cardiaque. L'athérome aortique est évalué, en particulier son épaisseur, corrélée au risque d'AVC lorsqu'elle dépasse 4 mm [55]. Cette épaisseur est mesurée en systole entre la jonction adventice-média et l'interface avec la lumière aortique [55]. Les caractéristiques morphologiques (échogénicité, irrégularités de surface, hétérogénéité, présence d'un thrombus) sont également visualisées.

## **CHAPITRE 2:**

### **ATHEROSCLEROSE ET DIABETE DE TYPE 2**

#### **1 – Données actuelles**

##### **1.1 – Significativité clinique**

Le diabète touche plus de 150 millions d'individus à travers le monde et près de 20 millions aux Etats-Unis. Il touche 6.2% de la population française de 20 à 70 ans, une prévalence en forte augmentation, parallèle à celle de l'obésité. La prévalence du diabète à travers le monde devrait progresser de 160% entre 2000 et 2050, avec déjà une augmentation de 40% en Amérique du Nord au cours de la dernière décennie [56,57]. Le diabète est caractérisé par un risque élevé de complications thrombotiques et ischémiques liés à l'athérombose pouvant atteindre les différents territoires artériels en particulier coronaires, cérébraux ou périphériques. La maladie coronaire est la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques, avec un risque pouvant être multiplié jusqu'à 4 par rapport aux non diabétiques [56]. En effet, le risque d'infarctus du myocarde est 3 à 5 fois plus élevé chez les diabétiques de type 2 que dans la population générale. Les diabétiques de type 2 sans antécédent d'événement coronaire ont le même RCV que les non diabétiques ayant un antécédent d'infarctus du myocarde. L'effet délétère du diabète sur l'athérosclérose est tel que le risque coronaire chez la femme diabétique rejoint celui de l'homme diabétique alors qu'il est nettement inférieur chez la femme non diabétique [58]. Par ailleurs, 70% des diabétiques meurent de mort cardiovasculaire et quand survient chez eux un événement ou une intervention cardiovasculaire, celui-ci a une évolutivité et un pronostic moins favorable

que chez les patients non diabétiques. Il est habituel de voir le diabétique comme un sujet accumulant les FDRCV: hyperglycémie, inflammation, hyperinsulinémie, dyslipidémie et hypertension artérielle. Le RCV élevé porté par les patients encore normaux glycémiques mais simplement insulino-résistants a fait identifier des facteurs de risque de survenue d'accident ischémique lié à l'insulino-résistance. Donc, globalement, le diabétique de type 2, du fait à la fois de l'hyperglycémie et de l'insulino-résistance accumule les facteurs de risque ischémiques et en particulier les facteurs prothrombotiques. L'incidence élevée d'événements ischémiques en rapport avec l'athérombose chez les patients diabétiques de type 2 s'explique à la fois par l'évolutivité globale et particulière de l'athérosclérose c'est-à-dire de la pathologie artérielle et d'autre part de la réactivité thrombotique qui est aussi particulière chez les patients diabétiques [59].

## **1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques**

La maladie coronaire est la première cause de mortalité et de morbidité chez les patients diabétiques, avec un risque pouvant être multiplié par 4 par rapport aux patients non diabétiques [60]. De plus, le diabète constitue un facteur de gravité de la maladie coronaire avec des lésions plus précoces, plus sévères, plus étendues sur des artères grêles et plus souvent compliquées d'insuffisance cardiaque. Les plaques d'athérosclérose des patients diabétiques comparées à celles de patients non diabétiques contiennent des noyaux nécrotiques plus volumineux, présentent une accumulation plus marquée de macrophages, de métalloprotéases matricielles, de radicaux libres oxygénés et de produits de glycation avancées. L'ensemble de ces éléments concourent à rendre la plaque plus instable [60]. Chez les patients diabétiques, l'endothélium et les monocytes circulants sont plus activés que chez les sujets non diabétiques et leur plasma est enrichi en LDL petites, denses et plus athérogènes.

Enfin, les taux plasmatiques de facteurs de la coagulation sont augmentés, alors que les taux d'antithrombine et de protéine C, facteurs anti-coagulants, sont diminués [60].

### **1.2.1 – Diabète de type 2 et athérosclérose**

Les maladies vasculaires, en particulier l'athérosclérose, sont la première cause de morbidité et de mortalité chez le diabétique. Le diabète augmente considérablement le risque de développer une coronaropathie, un accident vasculaire cérébral ou une artérite des membres inférieurs. La physiopathologie de la maladie vasculaire du diabétique fait intervenir des anomalies des monocytes circulants, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Les anomalies métaboliques qui caractérisent le diabète comme l'hyperglycémie, la dyslipidémie, le stress oxydatif et l'accumulation des AGEs (Advanced Glycation End Products) contribuent à la dysfonction endothéliale et à l'accentuation de la réponse inflammatoire au niveau vasculaire. De surcroît, les fonctions plaquettaires sont anormales chez le diabétique avec une grande production de facteurs prothrombotiques. L'ensemble de ces anomalies contribue aux événements cellulaires et moléculaires qui déclenchent l'athérosclérose et augmente à long terme le risque cardiovasculaire chez le patient diabétique [60].

#### **1.2.1.1 – Rôle de l'inflammation**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères à localisation intimale [61]. Le cholestérol LDL qui s'accumule dans l'espace sous-endothélial sous forme oxydée est l'agent d'agression initial entraînant la réaction inflammatoire. L'inflammation intervient à plusieurs niveaux du processus athéroscléreuse: activation de l'endothélium, recrutement de monocytes et de lymphocytes, production locale de cytokines pro-inflammatoires, production de protéases matricielles, dégradation des protéines de la

chape fibreuse, déstabilisation de la plaque, induction d'apoptose des différents composants cellulaires présents dans la plaque et formation d'un noyau lipidique procoagulant. Le diabète peut accélérer le développement des lésions artérielles et favoriser leur déstabilisation en amplifiant chacune de ces étapes [59].

### **1.2.1.2 – Anomalies lipidiques**

L'importance de lipides dans l'athérogénèse n'est plus contestée depuis qu'il a été clairement établi qu'une élévation anormale de la cholestérolémie augmentait le risque cardiovasculaire et surtout depuis que les essais cliniques de prévention primaire et secondaire chez les patients hypercholestérolémiques ou à risque vasculaire ont démontré qu'un abaissement du cholestérol plasmatique permettait de réduire ce risque [62,63]. Toutefois, le cholestérol circulant n'a pas le même pouvoir athérogène selon les lipoprotéines qui le portent.

Les LDL sont les lipoprotéines dont les taux sont le mieux corrélés au risque cardiovasculaire et à une athérosclérose précoce. Les LDL pénètrent dans l'espace sous-intimal et constituent le facteur déclenchant du processus. Chez les patients diabétiques, il existe une augmentation de la proportion de LDL petites et denses [64]. Ces dernières sont plus athérogènes du fait d'un catabolisme réduit et d'une diminution de leur affinité pour le récepteur aux apolipoprotéines (apo) B et E. De plus, cette élimination plus lente les rend plus sensibles à l'oxydation et à la glycation, majorant ainsi leurs effets athérogènes.

Les HDL ont plutôt un rôle protecteur dans l'athérosclérose. De grandes études épidémiologiques ont constamment retrouvé une relation inverse entre le taux de HDL et le risque de maladie coronaire [65]. De même, des études cas-témoins ont montré des taux de HDL plus bas chez des patients avec atteinte coronaire documentée par rapport à des patients indemnes d'artériopathie. Les HDL permettent l'épuration en cholestérol des tissus périphériques par un système de recyclage où le cholestérol est capté au niveau des muscles,



par exemple, puis transféré au niveau du foie. Chez les diabétiques, les taux de HDL sont diminués en raison d'une augmentation du catabolisme de la lipoprotéine [66]. En effet, l'hypertriglycéridémie associée au diabétique favorise un transfert des triglycérides contenus dans les VLDL vers les HDL. Enrichies, les molécules d'HDL deviennent des substrats pour les lipases hépatiques et sont plus rapidement éliminées. Les thiazolidinédiones, agonistes des récepteurs PPAR-gamma [67], récemment développées dans le traitement du diabète de type 2 ont un intérêt tout particulier dans ce contexte. Elles diminuent la résistance à l'insuline en réduisant les taux d'acides gras libres circulants. Leur administration s'accompagne d'une réduction de 30% des triglycérides plasmatiques et d'une augmentation de 13% des taux de HDL. De plus, les agonistes PPAR-gamma réduisent la production de PAI-1, de fibrinogène, d'endothéline 1 (un puissant vasoconstricteur) et réduisent la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) [68]. En agissant à la fois sur les lipides, la coagulation et l'inflammation, ces molécules représentent un traitement prometteur contre l'athérosclérose et ses complications chez les patients diabétiques.

### **1.2.1.3 – Dysfonction endothéliale**

Les cellules endothéliales constituent une interface métaboliquement active entre le sang et la paroi vasculaire. Elles contrôlent la perméabilité aux macromolécules et modulent le tonus vasomoteur. Elles préviennent la coagulation et la thrombose et interviennent dans la diapédèse leucocytaire.

L'endothélium synthétise des substances bioactives dont le monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines, l'endothéline et l'angiotensine II qui participent à la régulation des fonctions et de la structure des vaisseaux. Le NO empêche l'activation des plaquettes, limite l'inflammation en inhibant l'adhésion leucocytaire à l'endothélium, en diminuant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. Ces effets vasculoprotecteurs du NO sont

fortement altérés par le diabète tout comme la production de prostacycline [69]. Les médiateurs prostanoides vasoconstricteurs sont, à l'inverse, augmentés.

La vasodilatation endothélium-dépendante est diminuée chez les adultes diabétiques sans pathologie vasculaire connue. Cette dysfonction endothéliale apparaît très tôt au cours de la maladie puisqu'elle a pu être mise en évidence chez des enfants diabétiques de type 1 [70]. De surcroît, elle est associée à une augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne mesurée par échographie. L'hyperglycémie empêche la production de NO en bloquant l'activation de la NO synthase endothéliale et en augmentant la production de radicaux libres oxygénés, en particulier l'anion superoxide ( $O_2^-$ ).

#### **1.2.1.4 – Activation des monocytes circulants**

Les monocytes sont les acteurs centraux de l'athérogenèse. Ils favorisent la progression de la plaque en pénétrant dans la paroi et en attirant d'autres cellules inflammatoires (lymphocytes). Ils favorisent la rupture de la plaque en produisant des cytokines pro-inflammatoires, en induisant l'apoptose des cellules vasculaires et en nourrissant le noyau lipidique de leur cadavre cellulaire [71,72]. Leur importance dans la formation de la plaque peut être illustrée par le fait que la déficience en MCP-1 [73], un facteur chimiotactique des monocytes, ou en M-CSF [74], qui permet la maturation tissulaire des monocytes en macrophages, est associée chez la souris à une diminution majeure de la taille des plaques d'athérosclérose.

Plusieurs études ont montré que les monocytes isolés de patients diabétiques sont activés [75]. Ils adhèrent beaucoup plus à des cellules endothéliales en culture que les monocytes de sujets témoins [76]. Ils produisent plus d'anions superoxide et ont un pouvoir de phagocytose augmenté [77]. Les monocytes de diabétiques expriment également des taux

élevés de facteur tissulaire à leur surface, le facteur tissulaire étant l'un des principaux déclencheurs de la cascade de la coagulation [78].

### **1.2.1.5 – Recrutement et adhésion leucocytaire**

La migration des monocytes et des lymphocytes T dans l'intima occupe aussi une place centrale dans l'athérogénèse. L'adhérence des monocytes à l'endothélium implique la liaison de molécules de structure exprimées à la surface endothéliale, P-sélectine, VCAM-1 ou ICAM-1, à des ligands de type glycoprotéine ou intégrine présents sur les leucocytes. Ce sont essentiellement la P-sélectine et VCAM-1 qui sont impliqués dans l'initiation de l'athérosclérose [79]. Ces molécules sont peu ou pas exprimées à la surface d'un endothélium normal, mais leur expression est fortement augmentée au cours de la formation de la plaque. Elle peut être induite par les LDL oxydés ou par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-alpha ou IL1. Après avoir migré dans le sous-endothélium, les monocytes se différencient en macrophages qui captent et internalisent de grandes quantités de LDL oxydés par l'intermédiaire de récepteurs, dits éboueurs, Scavangers (SR-AI, SR-AII, CD36, CD68), pour se transformer en cellules spumeuses. Les cellules T qui pénètrent dans la plaque sont de type Th1. Elles produisent de grandes quantités d'interféron gamma. L'hyperglycémie, en diminuant la production de NO et en stimulant la génération de radicaux libres et l'expression de récepteurs pour les produits de glycation avancée (RAGE), augmente l'activation de facteur de transcription inflammatoire NF-kB [80]. Ce facteur régule l'expression de nombreux gènes codant pour les médiateurs inflammatoires: molécules d'adhérence endothéliale, chimiokines et cytokines précédemment décrites. En activant ce facteur de transcription, l'hyperglycémie augmente considérablement l'attraction, l'adhérence et la diapédèse des cellules inflammatoires, ainsi que la production de médiateurs pro-athérogènes qui participent à la progression des lésions et à leur rupture.

Des études immunohistochimiques ont montré que NF-kB est exprimé abondamment dans les cellules musculaires lisses contenues dans les plaques athéroscléreuses humaines. De surcroît, cette expression est précoce puisque une activation de ce facteur a été mise en évidence au niveau des bifurcations artérielles, avant même que ne se développe la plaque d'athérome [81]. Après une angioplastie artérielle chez le rat, NF-kB est exprimé dans les cellules musculaires lisses de la paroi et stimule l'expression de nombreux gènes, dont VCAM, ICAM-1 ou encore MCP-1 [82]. Il est intéressant de noter que plusieurs médicaments utilisés pour la prévention des accidents coronariens ischémiques comme les salicylés ou les statines (inhibiteurs de HMG CoA réductase) inhibent l'activation de NF-kB et doivent, en partie, leur efficacité à cet effet anti-inflammatoire [83].

#### **1.2.1.6 – Produits de glycation avancée des protéines**

Les produits de glycation avancée des protéines, ou protéines glyquées (AGEs pour advanced glycated end products) constituent une classe chimique à part, résultant de la fixation d'un sucre réducteur (glucose ou fructose) ou d'un aldéhyde sur une fonction amine N-terminale d'une protéine ou d'un acide aminé. Cette réaction se déroule sans participation enzymatique et forme un produit appelé base de Schiff; elle est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration du sucre. A la suite de cette première étape, un réarrangement moléculaire appelé réarrangement d'Amadori a souvent lieu. Le taux de formation de ces produits d'Amadori est, encore une fois, dépendant de la concentration en sucre. Ce réarrangement est suivi d'une réaction plus complexe qui aboutit à la formation des AGEs. Le taux de formation de ces composés est dépendant de la durée de l'hyperglycémie et il est fortement augmenté au cours du diabète. Les AGEs sont reconnus par des récepteurs spécifiques, dénommés RAGE, présents à la surface de nombreuses cellules [84]. L'activation des RAGE déclenche une réaction inflammatoire au niveau des cellules vasculaires, avec

activation de la voie NF- $\kappa$ B, expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhérence endothéliales [85].

L'importance des AGEs et de leur récepteurs dans l'athérosclérose est attestée par des études expérimentales qui montrent l'effet protecteur du blocage de l'activité RAGE contre l'athérosclérose de souris déficientes en apoE et rendues diabétiques par l'injection de streptozotocine. Les souris diabétiques développent plus d'athérosclérose et leurs plaques sont plus inflammatoires. Lorsque la stimulation des RAGE est bloquée par l'administration de récepteurs solubles, qui se lient compétitivement avec les AGEs et bloquent leur activité, l'athérosclérose des souris diabétiques n'est plus différente de celle des souris non diabétiques [86]. Ces travaux trouvent un écho chez l'homme puisque des travaux portant sur des analyses post-mortem d'artères coronaires humaines rapportent une très forte expression de RAGE dans les plaques de patients diabétiques par rapport aux patients non diabétiques [57].

#### **1.2.1.7 – Stress oxydatif**

Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire, induite soit par une production excessive de radicaux libres, soit par une diminution des défenses anti-oxydantes. Les effets des radicaux libres sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production. Ils induisent une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaire, une diminution du potentiel de membrane, une altération des protéines et de l'ADN avec comme conséquences la mort cellulaire et l'inflammation.

Au cours du diabète, la production de radicaux libres est accrue [87]. L'hyperglycémie induit une glycosylation auto-oxydative, aboutissant à un déséquilibre de la balance NADPH/NAD<sup>+</sup>.

Parallèlement, les mécanismes de défense antioxydante des diabétiques sont altérés. Les capacités fonctionnelles de la superoxide dysmutase sont réduites du fait de sa glycation.

Les taux de glutathion, de catalase, d'acide ascorbique sont diminués. Enfin, le HDL-cholestérol qui, outre ses capacités d'épuration du cholestérol tissulaire, présente un pouvoir antioxydant est diminué.

Une autre conséquence du stress oxydatif chez le diabétique est l'augmentation des taux de LDL oxydés (LDLox), dont le rôle dans le processus athéromateux a été largement démontré [88]. Les LDLox sont tout d'abord responsables d'une activation des cellules endothéliales, en induisant la production de substances prothrombotiques (thrombomoduline, PAI-1), en stimulant la production de molécules vasoconstrictrices (endothéline 1, thromboxane A2) et en inhibant la production de molécules vasodilatatrices (NO). Ensuite, elles favorisent la production d'agents chimiotactiques pour les monocytes circulants (MCP1) favorisant leur adhérence à l'endothélium. Elles sont responsables de la formation des cellules spumeuses à partir des macrophages contenus dans la paroi et, enfin, les LDLox ont une action cytotoxique directe sur les cellules endothéliales.

#### **1.2.1.8 – Instabilité de la plaque**

En plus d'accélérer le processus athéromateux, le diabète favorise l'instabilité des plaques et précipite la survenue d'événements cliniques comme le syndrome coronarien aigu au niveau coronaire ou l'accident vasculaire cérébral à l'étage carotidien. La stabilité de la plaque d'athérome dépend essentiellement de plusieurs éléments intrinsèques et extrinsèques ; la stabilité de la plaque est un élément déterminant. A partir de pièces anatomopathologiques d'artères coronaires, il a pu être démontré que les cellules inflammatoires comme les macrophages et les lymphocytes T menacent la stabilité de la plaque. Ces cellules sont beaucoup plus abondantes dans les plaques compliquées que dans les plaques stables. A l'inverse, les cellules musculaires lisses et le collagène en formant une chape fibreuse stabilisent la plaque. Ces deux composants sont moins abondants dans les plaques rompues

que dans les plaques stables [89]. D'ailleurs, chez la souris diabétique et déficiente en apoE, les plaques athéroscléreuses sont beaucoup plus riches en cellules inflammatoires que celle des souris non diabétiques. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme [57].

Les MMPs sont des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire et fragilisent la plaque d'athérosclérose. Leur activité est augmentée au cours du diabète [90]. In vitro, les cellules endothéliales d'aorte de bœuf lorsqu'elles sont mises en présence de fortes concentrations de glucose expriment la MMP-9. In vivo, sur deux modèles de rongeurs diabétiques, il a été rapporté une augmentation de l'activité MMP-9 à la fois dans le sang et dans la paroi aortique.

Enfin, le noyau lipidique, qui menace aussi grandement la stabilité de la plaque, est plus volumineux dans les lésions de diabétiques avec un nombre plus important de cellules musculaires lisses et de macrophages en apoptose. Il est intéressant de noter que les plaques du diabétique présentent une augmentation considérable de l'inflammation au niveau de l'adventice avec une production accrue de cytokines (TNF, IL6), de chimiokines et une forte expression de molécules d'adhérence par les fibroblastes [91].

#### **1.2.1.9 – Remodelage artériel**

Il existe un remodelage précoce de la structure artérielle dans le diabète, avec à la fois une hypertrophie de la média et de l'adventice, qui apparaît chez l'animal avant les lésions d'athérosclérose de l'intima. L'hypertrophie de la média est liée essentiellement à une accumulation de collagène et de matrice extracellulaire. L'épaississement de l'adventice est en relation avec des mécanismes physiopathologiques multiples: une accumulation de collagène et de fibroblastes, une augmentation de la densité des vasa vasorum et la présence de graisse péri-vasculaire [92]. L'hypothèse est soulevée que le remodelage de la partie externe de l'artère module directement la stabilité des plaques d'athérome via la sécrétion de

cytokines et/ou de facteurs pro-thrombotiques. L'impact du remodelage de l'adventice et de l'espace péri-adventiciel sur le développement des lésions athéromateuses de l'intima et la survenue des événements cardiovasculaires n'est pas connu et nécessite d'être à présent mieux caractérisé chez le diabétique.

### **1.2.2 – Diabète de type 2 et athérothrombose**

Les phénomènes impliqués dans la thrombose interviennent dans l'athérogénèse elle-même. Le phénomène autorépétitif de thrombose développée sur les plaques puis habitée par les cellules musculaires lisses pariétales pour aboutir à une évolution des plaques est encore amplifié chez les patients diabétiques. Les facteurs et mécanismes de la thrombose sont impliqués dans l'inflammation et la prolifération cellulaire et vice et versa. L'insulino-résistance et le diabète sont des pathologies inflammatoires expliquant l'exacerbation de ces mécanismes. L'hypofibrinolyse habituellement mise en exergue au niveau intravasculaire existe également au niveau intrapariétal. Ces phénomènes de la fibrinolyse tissulaire jouent un rôle clé dans les phénomènes de turn-over par résorption du collagène. L'hypofibrinolyse du diabète explique l'accumulation de collagène et le caractère évolutif et fibreux des lésions d'athérosclérose et de resténose, caractéristiques du patient diabétique.

Les phénomènes de thromboses participent à la gravité et à l'évolutivité de la microangiopathie. En effet, l'évolution habituelle d'une thrombose artérielle est, pendant les premières heures ou jours de son développement avant sa stabilisation, d'être instable et de microemboliser en distalité. L'exacerbation de ces phénomènes chez le diabétique participe à expliquer la gravité de la microangiopathie. Le diabétique de type 2 accumule donc les développements accélérés de la macroangiopathie, de la microangiopathie et l'hyperthrombogénicité. Phénomènes potentialisés par leur interaction: la macroangiopathie exacerbe la réaction thrombotique des patients déjà hyperthrombogènes et la



microangiopathie participe à expliquer l'importance, le type et la gravité des conséquences ischémiques tissulaires des événements thrombotiques. Le diabétique de type 2 est ainsi un athérothrombotique en puissance [59].

### **1.2.2.1 – Anomalies plaquettaires**

Les diabétiques sont caractérisés par une hyperactivité plaquettaire qui, malgré un traitement antiplaquettaire systématique, est totalement prédictive du risque cardiovasculaire. Cette hyperactivité plaquettaire est corrélée au taux d'hémoglobine A1C et au chiffre de plaquettes. Cette hyperactivité plaquettaire mesurée fonctionnellement ex vivo sur les test d'agrégabilité est totalement corrélée aux marqueurs d'activation in vivo des plaquettes, comme la formation de microparticules membranaires plaquettaires, l'expression du CD-40L et de la P-sélectine, et la libération de leur forme soluble au niveau plasmatique [93]. La dynamique de la formation des thromboses plaquettaires a permis de comprendre que les plaquettes qui se déposent, s'agrègent, rentrent en compétition avec les conditions hémodynamiques qui tendent à fragmenter le thrombus en développement. Cette dynamique explique qu'au cours de la formation du thrombus plaquettaire, pendant des temps relativement longs, se situant en dizaines d'heures voire en jours, il y a des fragments formés de microagrégats plaquettaires qui sont embolisés à partir du thrombus en formation et qui vont emboliser le lit capillaire d'aval des tissus irrigués par l'artère où se développe le processus thrombotique. Il existe donc une microangiopathie thrombotique ischémique et on comprend donc comment, chez le diabétique, la thrombose plaquettaire va participer non seulement aux accidents ischémiques aigus massifs caractéristiques de la macroangiopathie mais aussi participer à l'évolutivité et la gravité de la microangiopathie.

Les données expérimentales montrent que l'hyperglycémie par elle-même intervient dans cette hyperactivité plaquettaire chez le diabétique. Les premières études ayant apporté

cette démonstration ont été des études d'évaluation de la fonctionnalité plaquettaire au cours d'épreuves de bilan glycémique en euglycémie ou hyperglycémie [94]. Un certain nombre de voies métaboliques expliquant cet effet direct a été identifié comme par exemple la mise en évidence de l'effet du glucose sur l'activation de canaux calciques [95]. En plus du glucose lui-même, les adipokines et en particulier la leptine jouent un rôle direct d'activation plaquettaire en faisant intervenir en particulier la voie JAK 2 [96]. Les études sur une implication de l'adiponectine sont plus indirectes [97]. L'hyperactivité de l'hémostase primaire, caractéristique des sujets diabétiques, provient de l'hyperactivité plaquettaire elle-même mais aussi de l'augmentation des cofacteurs en particulier du facteur Willebrand. Ainsi, le rapport entre l'augmentation du facteur Willebrand et le risque thrombotique chez les patients diabétiques est connu de longue date et en est un exemple [98]. Cette hyperactivité plaquettaire au cours du diabète s'accompagne d'un raccourcissement de la durée de vie des plaquettes et d'un taux de renouvellement très accéléré. Cette accélération du turn-over plaquettaire est bien mise en évidence par différents moyens depuis de nombreuses années par exemple sur le volume plaquettaire moyen augmenté chez les sujets diabétiques, l'augmentation du volume plaquettaire moyen traduisant une hypergénérat ion rapide de plaquettes [99] confirmée par des études plus récentes [100] ou par des moyens indirects de mesure de réapparition de l'expression de la MDA par les plaquettes.

### **1.2.2.2 – Anomalies de la coagulation**

Le diabétique se caractérise aussi par une hypercoagulabilité marquée par une augmentation de tous les facteurs de coagulation: le facteur VIII dont l'augmentation est expliquée en partie par son lien avec le facteur Willebrand mais aussi le facteur VII, le facteur IX. Cette hypercoagulabilité se traduit par une augmentation des différents marqueurs d'activation de la coagulation en particulier des D-dimères et des complexes thrombine-

antithrombine et par un raccourcissement des tests globaux de coagulation comme le TCA [101], le fibrinogène est augmenté au même titre que les autres facteurs liés à l'inflammation. Une des caractéristiques de l'athéromatose et en particulier chez le diabétique est que celle-ci s'accompagne d'une augmentation des microparticules circulantes. Ces microparticules sont des fragments membranaires de cellules activées exprimant d'une part des phospholipides anioniques permettant la constitution à leur surface des complexes des facteurs de la coagulation et d'autre part, en fonction de l'origine cellulaire, la possibilité d'expression de facteur tissulaire. Ces microparticules leucocytaires exprimant le facteur tissulaire se lient aux plaquettes activées et aux agrégats plaquettaires grâce à des molécules d'adhésion spécifiques, en particulier à la P-sélectine [102]. Le thrombus plaquettaire se constituant, va fixer ces microparticules circulantes et le facteur tissulaire qu'elles portent va permettre de déclencher localement la cascade de la coagulation dans une atmosphère phospholipidique adéquate pour l'organisation moléculaire des facteurs de coagulation. Cette fixation aux plaquettes des leucocytes activés, monocytes, polynucléaires entiers ou sous leur forme de microvésicules caractérise les états thrombotiques artériels en particulier chez les patients diabétiques [103]. Le diabète de type 2 et les syndromes métaboliques se caractérisent par une augmentation de ces microparticules exprimant le facteur tissulaire [104,105]. Ces microparticules proviennent des différents types cellulaires et sont en rapport avec l'hyperglycémie mais pas uniquement avec elle. La distribution de ces microparticules cellulaires n'est pas exactement la même dans les diabètes de type 1 et les diabètes de type 2 [106]. Les phénomènes médiés par les cytokines type adipokine ou les phénomènes d'oxydoréduction jouent un rôle dans cette vésiculation [107]. La leptine augmente la formation des microvésicules et l'expression du facteur tissulaire [108]. Les adipokines et en particulier la leptine influent directement sur l'activité procoagulante en particulier des monocytes par une stimulation de l'expression de facteur tissulaire réalisant un lien entre

obésité, insulino-résistance, diabète et risque cardiovasculaire [109]. L'intérêt de ce travail est, outre la démonstration de l'implication directe de la leptine, de montrer que les modifications induites par un régime et une perte de poids aboutissent à la diminution attendue de la leptine et à une diminution significative de l'expression du facteur tissulaire par les monocytes stimulés par le LPS.

### **1.2.2.3 – Anomalies de la fibrinolyse**

D'une façon générale, l'insulino-résistance et le diabète s'accompagnent d'une hypofibrinolyse. Cette hypofibrinolyse est en rapport avec d'une part, une diminution de l'activité fibrinolytique en rapport essentiellement avec l'augmentation des inhibiteurs et particulièrement du PAI-1 et d'autre part, avec une diminution de susceptibilité à la fibrinolyse des réseaux de fibrine chez le diabétique. Les modifications du réseau de fibrine chez le diabétique se traduisent par des fibres de fibrine beaucoup plus fines et un réseau beaucoup plus dense donc, une structure beaucoup moins sensible au système fibrinolytique [110,111]. Ceci est en rapport d'une part avec la production de thrombine qui est augmentée globalement chez le patient diabétique du fait de l'augmentation de la cascade de la coagulation, tant en efficacité, avec les surfaces phospholipidiques supplémentaires exposées par les microparticules, qu'en concentration avec l'augmentation des facteurs [112]. D'autre part, le fibrinogène qui parmi les facteurs de coagulation est la molécule qui a la durée de vie la plus longue est celle qui est la plus susceptible à la glycation. Chez les patients diabétiques, le fibrinogène glyqué est beaucoup moins sensible au système fibrinolytique que le fibrinogène non glyqué [113]. La majorité des recherches a surtout porté sur la diminution du système fibrinolytique et l'augmentation des inhibiteurs, en particulier du PAI-1 induisant un état d'hypofibrinolyse prédicteur du risque cardiovasculaire [98]. Cette augmentation du PAI-1 est d'origine vasculaire endothéliale mais provient aussi de la graisse viscérale [114,115]

expliquant les liens étroits entre l'augmentation aussi bien en protéine qu'en activité du PAI-1 en lien avec l'insulinorésistance [116].

#### **1.2.2.4 – Hyperglycémie et thrombose**

L'ensemble des points évoqués reliant l'hyperthrombogénicité du diabète à l'hyperglycémie montre que l'hyperglycémie joue un rôle direct dans l'augmentation du risque thrombotique. C'est probablement une explication au fait que l'hyperglycémie réactionnelle aux épisodes aigus comme les infarctus du myocarde est un marqueur du risque de mortalité durant la période hospitalière [117]. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de l'hémostase primaire, de la coagulation et la diminution de la fibrinolyse associées au diabète amène à se poser la question du risque de thromboses certes artérielles mais aussi veineuses en rapport avec le diabète. Si le diabète n'est pas un facteur majeur de thrombose veineuse, les études qui ont spécifiquement évalué le rôle du diabète dans le risque thrombo-embolique veineux qu'il soit idiopathique ou secondaire montrent que le diabète confère un risque relatif aux alentours de 3 à 4 pour la thrombose veineuse, ce qui reste modéré [118,119].

### **1.3 – Rôle de l'imagerie non invasive in vivo**

L'utilisation des techniques d'imagerie non invasives pour la détection de l'athérosclérose et de ses conséquences peut aider à stratifier le risque cardiovasculaire et à adapter les thérapeutiques à l'échelon individuel. Cependant, certaines de ces techniques ne sont pas encore complètement validées chez les patients diabétiques. Nous nous attacherons dans les paragraphes suivants à résumer l'intérêt ainsi que la fiabilité diagnostique et prédictive de trois de ces techniques chez le patient diabétique de type 2, utilisées soit comme marqueur d'athérosclérose (EIMc, score calcique coronaire), soit comme outil d'évaluation anatomique directe de la plaque d'athérosclérose (angioscanner multibarrettes).

## **1.3.1 – Diabète de type 2 et athérosclérose carotidienne**

### **1.3.1.1 – Epaisseur intima-média**

Plusieurs études épidémiologiques randomisées ont démontré la valeur de l'EIMc comme marqueur de risque de la survenue d'un événement cardiovasculaire. Une augmentation de l'EIMc, même en l'absence de maladie obstructive de la lumière carotidienne, est associée à risque d'IDM et d'AVC chez les sujets de plus de 65 ans [19], comme chez les patients plus jeunes [120,121]. Par ailleurs, une augmentation de l'EIMc de seulement 0.03 mm par an serait associée à un doublement du risque relatif d'IDM et de mortalité d'origine cardiaque au cours du suivi [120]. Il n'existe qu'une relation modeste entre EIMc et maladie coronaire obstructive, aussi bien chez les patients non diabétiques [122] que chez les diabétiques [123], suggérant que ce paramètre est un marqueur de la charge athéromateuse plus qu'un index de sévérité de la maladie coronaire.

Chez les patients diabétiques, une EIMc augmentée est associée aux facteurs de risque d'athérosclérose tels que: hypertriglycéridémie et ratio cholestérol total/LDL cholestérol bas [124], âge et IMC [125], lipoprotein(a) [126], microalbuminurie [127], et dysfonction endothéliale et inflammation de bas grade [128]. L'insulinorésistance seule, même en l'absence de diabète clinique, est associée à une augmentation de l'EIMc [129].

Le diabète est un facteur prédictif indépendant de la progression de l'EIMc [130], et celle-ci semble progresser plus rapidement chez les diabétiques [130]. Cette progression accélérée est en partie en rapport avec le contrôle glycémique mesuré aussi bien par mesure rapide du niveau de glucose plasmatique que par le niveau d'hémoglobine HbA1c [131]. D'autre part, l'âge et l'épaisseur de la paroi carotidienne [131], ainsi que l'hypertension systolique et le développement d'une néphropathie [131], ont été identifiés comme des facteurs prédictifs de la progression de l'EIMc.

La mesure répétée de l'EIMc a été utilisée comme moyen d'évaluation de l'efficacité des traitements médicaux dans de nombreuses études [132,133] dans la population générale mais seulement dans un nombre limité d'études chez les patients diabétiques. Nathan et al. [134] ont conduit une étude de suivi à court puis long-terme de 1 229 diabétiques de type 1 randomisés pour recevoir un traitement hypoglycémiant standard ou intensif, après ajustement des deux populations pour l'âge et le sexe. La progression de l'EIMc n'était pas différente à la fin de la première année de suivi entre les sujets contrôles et tous les patients diabétiques, mais l'EIMc avait progressé de manière significativement plus importante chez les patients diabétiques par rapport au groupe témoin au terme de 6.5 ans de suivi. D'autre part, au terme de cette période, l'EIMc avait également progressé de manière significativement plus importante chez les patients diabétiques ayant reçu un traitement hypoglycémiant standard que chez ceux traités de manière intensive. Dans une autre étude [135], la mesure itérative de l'EIMc a été utilisée pour évaluer l'effet d'un traitement par statines en comparaison à un traitement par placebo chez 250 patients diabétiques de type 1. Au terme de 2 ans de suivi, il n'y avait pas de différence de progression de l'EIMc entre les 2 groupes, bien que le nombre d'événements cardiovasculaires ait été significativement moins important ( $p = 0.006$ ) chez les patients traités par statines. L'efficacité de traitement par statines sur la réduction des événements cardiovasculaires chez les diabétiques était en accord avec les résultats de la « Heart Protective Study » [136] et de la « Collaborative Atorvastatine Diabetes Study » [137]. Cependant, pour démontrer un effet sur la progression de l'EIMc, un suivi plus long était nécessaire. Finalement, dans deux petits essais randomisés chez des patients diabétiques de type 2, un traitement antiagrégant plaquettaire de type aspirine, ticlopidine [138] ou cilostazol [139] permettait de ralentir la progression de l'EIMc après un suivi de 3 ans et 1 an, respectivement.

Même si les différentes études présentées indiquent clairement une charge athéroscléreuse plus importante et donc un risque plus élevé chez les patients diabétiques avec EIMc augmentée, il existe un certain nombre de limitations. D'abord, si l'EIMc est un facteur prédictif indépendant de la survenue d'événements cardiovasculaires dans la population générale, cette évidence est plus modeste dans la population diabétique. Un exemple isolé chez les diabétiques est représenté par l'étude réalisée par Yamasaki et al. [131] chez 287 patients japonais diabétiques de type 2, dans laquelle l'EIMc de base était identifiée comme un facteur prédictif indépendant de maladie coronaire non fatale (angor et IDM) après une période de 3 ans de suivi. D'autre part, bien que la progression de l'EIMc puisse être ralentie aussi bien chez les patients diabétiques que chez les non diabétiques, peu de choses sont connues sur la significativité pronostique de la progression de l'EIMc dans ces 2 populations. Finalement, aucune étude n'a encore démontré la valeur pronostique progressive de l'EIMc en comparaison aux autres facteurs de risque conventionnels chez les patients diabétiques comme non diabétiques.

### **1.3.1.2 – Imagerie directe de la plaque d'athérosclérose**

De manière assez paradoxale, très peu d'études sont actuellement disponibles dans la littérature sur l'étude spécifique de la plaque d'athérosclérose carotidienne par les techniques d'imagerie non invasive classiques chez les patients diabétiques de type 2, en comparaison aux patients non diabétiques. Il est admis que le diabète est associé à la présence de plaques d'athérosclérose carotidiennes de volume modéré à important. Plusieurs études échographiques ont montré une association entre la présence de plaques carotidiennes de faible échogénicité, plus sujettes à rupture, et un risque plus élevé d'événement cérébrovasculaire chez les patients non diabétiques [140,141]. Une seule étude a comparé l'échogénicité des plaques carotidiennes chez 47 patients diabétiques de type 2 et 51 patients



non diabétiques [142]. Les diabétiques avaient des plaques plus étendues ( $27.8 \pm 21.8$  vs  $22.0 \pm 11.7$  mm<sup>2</sup>,  $p = 0.05$ ) et plus hypoéchogènes ( $37 \pm 14.8$  vs  $45.5 \pm 15.4$ ,  $p = 0.007$ ) que les non diabétiques, alors qu'il n'existait pas de différence concernant l'EIMc. Ces données suggèrent un risque plus élevé de survenue d'événements cardiovasculaires chez les diabétiques, et soulignent les limites de la mesure de l'EIMc dans cette population. La mesure de l'échogénicité d'une plaque tend à refléter sa composition. Les plaques hypoéchogènes sont plus riches en élastine, en lipides et en cellules inflammatoires, alors que les plaques échogènes contiennent plus de calcium et de tissu fibreux [143]. Burke et al. [57] ont montré que le coeur nécrotique et le contenu en macrophages de la plaque sont plus important chez les diabétiques que chez les non diabétiques. Ces données sont concordantes avec celles de l'étude précédente [142] car les plaques hypoéchogènes ont un contenu en macrophages plus élevé, une augmentation de l'activité des métalloprotéinases [144], et un coeur lipidique plus large que les plaques échogènes.

### **1.3.2 – Diabète de type 2 et athérosclérose coronarienne**

#### **1.3.2.1 – Score calcique coronaire**

Cause majeure de morbi-mortalité, la maladie coronaire est particulièrement redoutée chez le diabétique en raison du caractère silencieux de son développement, de son pronostic péjoratif, et aussi des difficultés de son dépistage. Les techniques non invasives classiques (test d'effort, scintigraphie myocardique, échographie de stress, IRM de perfusion) visant à rechercher une coronaropathie comportent toutes des limites de faisabilité, d'interprétabilité et surtout de rentabilité pronostique [145], et le recours à la coronarographie, technique de référence, ne peut naturellement pas être systématique dans le cadre d'un dépistage à large échelle en prévention primaire. De nouveaux outils de dépistage se sont développés pour

évaluer le risque coronaire et déterminer quel patient devrait bénéficier d'explorations invasives. Parmi ceux-ci, la mesure du score calcique coronaire (SCC) paraît particulièrement prometteuse. Comme précédemment décrit, cette mesure offre un double intérêt diagnostique et pronostique.

- Intérêt diagnostique:
  - l'absence de calcification coronaire rend très improbable la présence de plaque d'athérosclérose, y compris de plaques instables. La constatation d'un score faible laisse présager de l'absence de survenue d'incident cardiovasculaire au cours des 2 à 5 ans à venir. Un score inférieur à 100 est associé à une faible probabilité (moins de 3%) de sténose significative (supérieure à 50%) à la coronarographie [22].
  - un test positif indique la présence de plaques d'athérome sur le réseau coronarien. Plus le score calcique est élevé, plus la probabilité de coronaropathie est grande. Il n'existe cependant pas de relation linéaire entre ces deux données et il n'y a pas de corrélation entre le siège des calcifications et la localisation des sténoses coronaires. La présence de calcification coronaire est sensible, mais peu spécifique pour détecter une maladie coronaire obstructive [22].
  - un score calcique très élevé est associé à un risque d'événement cardiovasculaire modéré à élevé au cours des 2 à 5 ans à venir.
  - l'excellente valeur prédictive négative du SCC, qui se situe entre 96 et 100%, permet d'écarter le diagnostic de maladie coronaire notamment chez les patients symptomatiques ayant un SCC nul [22]. Ainsi, les explorations peuvent être réduites, notamment dans des groupes de patients chez lesquels la valeur diagnostique des épreuves non invasives de dépistage n'est pas très performante. Toutefois, un SCC bas

mais non nul, paraît moins fiable pour écarter la présence d'une maladie coronaire [22].

- Intérêt pronostique:
  - le SCC permet de prédire le risque d'événement coronaire chez des patients asymptomatiques [22]. Sa valeur pronostique paraît particulièrement intéressante dans les populations à risque intermédiaire ou fort, mais assez peu dans les populations à risque faible. Le SCC apparaît également avoir une valeur pronostique indépendante des autres FDRCV. En effet, Anand et al. [146] démontrent chez 118 patients diabétiques asymptomatiques que le SCC est significativement plus prédictif d'événements coronaires que le score de Framingham fréquemment utilisé dans cette population.
  - Raggi et al. [147] ont suivi, pendant 5 ans, 10 377 patients asymptomatiques, dont 903 diabétiques. Ces derniers étaient plus âgés, plus souvent hypertendus et fumeurs que les non diabétiques. Le SCC était significativement plus élevé chez les diabétiques ( $281 \pm 567$  vs  $119 \pm 341$  ;  $p < 0.0001$ ). Le taux de mortalité augmentait avec le SCC chez tous les patients, mais après ajustement avec les autres FDRCV, l'augmentation du SCC était corrélée à un plus fort taux de mortalité chez les diabétiques par rapport aux non diabétiques. Lorsque le SCC était nul, les diabétiques présentaient le même taux de survie que les non diabétiques.
  - Qu et al. [148] pondèrent ces résultats dans leur étude de suivi pendant plus de 6 ans de 1312 patients (dont 269 diabétiques). Les auteurs ont étudié la survenue d'IDM non fatal ou de décès d'origine cardiovasculaire pour le critère primaire, et tout événement vasculaire pour le critère secondaire. Chez le diabétique avec un SCC élevé, le taux d'événement était quatre fois plus important que chez les non diabétiques ayant un SCC bas. Cependant, il n'existait pas de relation significative entre le SCC et la

survenue d'événement cardiovasculaire lors des 6 ans de suivi chez les patients diabétiques. Une telle corrélation était, en revanche, mise en évidence chez les non diabétiques, ce qui pourrait sous-entendre que le SCC a une moindre valeur pronostique chez les diabétiques.

### **1.3.2.2 – Imagerie directe de la plaque d'athérosclérose**

Chez les patients diabétiques de type 2, l'angioscanner multibarrettes est de plus en plus utilisé pour étudier la distribution et la composition des plaques d'athérosclérose coronariennes. Les études disponibles dans la littérature comparant ces paramètres chez les patients diabétiques et les patients non diabétiques ne sont pas si nombreuses. Leurs résultats sont parfois discordants. Plusieurs études ont montré un pourcentage plus élevé de plaques non calcifiées (ou hypodenses) et de plaques calcifiées, et un pourcentage relativement bas de plaques mixtes [149,150] chez les diabétiques par rapport aux non diabétiques, ce qui peut être expliqué par la progression rapide de l'athérosclérose. Cependant, dans une étude récente étudiant 416 patients symptomatiques dont 61 diabétiques de type 2, Ibebuogu et al. [151] ont montré que les patients diabétiques présentaient un nombre plus important de segments coronaires porteurs de plaques mixtes par rapport aux non diabétiques ( $1.67 \pm 2.01$  vs  $1.23 \pm 1.61$ ,  $p = 0.05$ ), alors qu'aucune différence n'était rapportée concernant la présence de plaques non calcifiées et calcifiées entre les 2 groupes. Par ailleurs, presque la moitié (43%) des patients diabétiques avaient un SCC > 400 versus 29% des patients non diabétiques ( $p = 0.03$ ). Dans l'une de nos études, nous nous sommes attachés à évaluer la prévalence et les caractéristiques des plaques d'athérosclérose coronariennes par angioscanner multibarrettes chez des patients asymptomatiques diabétiques de type 2 sans atteinte coronarienne connue mais présentant des lésions d'athérosclérose carotidiennes concomitantes. Aucune plaque coronarienne n'était détectée chez 11 (26.2%) patients. La présence de plaques

d'athérosclérose était détectée chez 31 (73.8 %) patients. Un total de 147 segments coronaires avec des plaques étaient identifiés, parmi lesquels 11 (7.5%) contenaient des plaques hypodenses, 28 (19%) des plaques mixtes et 108 (73.5%) des plaques calciques. La présence de plaques hypodenses était notée chez quatre (26.7%) des 15 patients qui n'avaient pas de calcifications coronariennes. La majorité des plaques calcifiées et hypodenses étaient non obstructives alors que la majorité des plaques mixtes étaient obstructives. La présence d'une maladie obstructive était notée chez neuf des 11 patients avec un score calcique élevé (> 400). Cette étude préliminaire démontre qu'une proportion élevée de patients diabétiques de type 2 asymptomatiques ne présentent aucune plaque coronarienne détectable par angioscanner multibarrettes malgré la présence concomitante de lésions d'athérosclérose carotidiennes. Cette étude a fait l'objet d'une publication internationale dans « *Archives of Cardiovascular Diseases* » (Annexe C) [152]. La distribution et la composition des plaques coronariennes chez le diabétique de type 2 peuvent donc varier en fonction du niveau de risque du patient. Dans une étude récente de suivi (33 mois) chez des patients diabétiques sans maladie coronaire connue, l'angioscanner multibarrettes permettait d'identifier un groupe de patients à risque particulièrement élevé de survenue d'événements cardiovasculaires [153]. Le score de charge athéromateuse permettait d'améliorer significativement la valeur pronostique des facteurs de risques conventionnels ( $p < 0.001$ ).

Par ailleurs, la combinaison des marqueurs morphologiques et cellulaires d'athérosclérose préclinique, en plus de ces facteurs de risque conventionnels, peut aider à améliorer la prévention cardiovasculaire chez les patients diabétiques. C'est ce que nous nous sommes attachés à démontrer chez 56 diabétiques de type 2 à niveau de risque cardiovasculaire différent. Dans cette étude, nous avons rapporté une association entre le taux plasmatique de microparticules endothéliales EMP-CD144+ et la présence de plaques coronariennes non calcifiées, donc potentiellement instables, détectées par angioscanner

multibarrettes. Les microparticules endothéliales pourraient donc être utilisées comme marqueur de plaques instables et aider à améliorer la prédiction du risque cardiovasculaire chez les diabétiques à risque intermédiaire. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans « *Atherosclerosis* » (Annexe D) [154].

Schuijf et al. ont rapporté une sensibilité et une spécificité de l'angioscanner de 95% pour la détection des sténoses coronaires. L'inclusion des segments ininterprétables réduit la sensibilité et la spécificité à 81 et 82%, respectivement [155]. Dans une étude évaluant l'efficacité diagnostique de l'angioscanner 16-barrettes, aucune différence statistiquement significative n'était mise en évidence entre les patients diabétiques et les non diabétiques [156]. La valeur prédictive négative de l'angioscanner était de 98 et 100% dans l'analyse par segment et par patient, respectivement [156]. Dans une étude plus récente avec scanner 64-barrettes, les patients diabétiques de type 2 avaient significativement plus de sténoses significatives  $\geq 70\%$  dans au moins un segment (33% vs 18%,  $p = 0.013$ ), alors que 11% des 2 groupes avaient une sténose de 50-70% (non significatif) [151]. Dans une autre étude toujours avec scanner 64-barrettes, la prévalence de maladie coronaire évaluée chez 70 patients diabétiques de type 2 et asymptomatiques révélait que la majorité des patients (80%) avaient une sténose coronaire, significative ( $> 50\%$ ) chez 26% d'entre eux et non significative dans 54% des cas [150].

Cependant, le scanner coronaire possède plusieurs limites dans son utilisation spécifique chez les patients diabétiques. Il faut d'abord souligner sa définition spatiale inférieure à celle de la coronarographie conventionnelle, rendant l'analyse des vaisseaux de petite taille (fréquents chez les diabétiques) plus aléatoire. Dans les analyses comparatives, un nombre important de segments coronaires ne sont pas analysés et sont donc retirés de l'analyse. Une atteinte des petits troncs distaux, s'ils ne changent pas forcément la prise en

charge thérapeutique d'un patient diabétique asymptomatique, représente cependant un tournant évolutif influant sur le suivi et les médicaments utilisés (bêta-bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, anti-agrégants plaquettaires). La seconde limitation et probablement la plus importante tient à la fréquence des calcifications coronaires du scanner coronaire chez les patients diabétiques. Lorsque les artères sont très infiltrées et calcifiées, les performances du scanner coronaire décroissent fortement. Ainsi, chez les patients diabétiques de plus de 60 ans ou chez ceux avec de nombreux facteurs de risque cardiovasculaire, la probabilité d'un scanner coronaire rigoureusement normal permettant d'éliminer une maladie coronaire silencieuse est faible; le scanner risquant de retrouver des images de calcifications importantes limitant l'interprétation sur l'éventualité de sténoses coronaires significatives sous jacentes, et contraignant à la réalisation d'une coronarographie diagnostique, source d'injections supplémentaires d'iode. Par ailleurs, les irradiations générées par le scanner coronaire pourraient devenir problématiques en cas de recours répété à cet examen dans un but de dépistage. Enfin, il est important de conclure en disant que si le scanner coronaire peut permettre un diagnostic de maladie coronaire chez des patients asymptomatiques sélectionnés, son utilité chez les diabétiques asymptomatiques n'a pas, à ce jour, été évaluée par rapport aux méthodes traditionnelles de détection d'ischémie myocardique en prenant en compte un critère clinique comme la réduction des événements ischémiques.

## **2 – Protocole CAPHEPLAD**

Ci-dessous un descriptif détaillé du protocole CAPHEPLAD qui a donné lieu à deux publications internationales sur le thème « Imagerie de l'athérosclérose chez le sujet diabétique de type 2 » (Annexes C et D).

### **2.1 – Titre**

Intitulé du protocole: étude CAPHEPLAD ou « CARactérisation PHEnotypique des PLAques Athéromateuses chez les sujets Diabétiques en fonction de l'existence d'un syndrome métabolique associé ».

## **2.2 – Promoteur**

Hospices Civils de Lyon, Direction de la Recherche, 3 Quai des Célestins, 69229 Lyon Cedex.

## **2.3 – Investigateur principal**

Madame le Docteur Sophie BERNARD; Fédération d'Endocrinologie, de Diabétologie et de Nutrition, INSERM U870, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, 28 avenue du Doyen Lépine, 69677 Bron Cedex; Tél: 04.72.68.13.01; Fax: 04.72.68.13.07; E-mail: sophie.bernard@chu-lyon.fr.

## **2.4 – Contexte scientifique**

Les complications cardiovasculaires ischémiques représentent la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité chez les diabétiques. Elles sont responsables de plus de la moitié des décès et ne se révèle souvent qu'au stade des complications [157]. Pour optimiser la prévention cardiovasculaire des patients diabétiques, il faut pouvoir repérer les sujets à très haut risque pour les traiter de façon efficace et éviter de traiter les sujets à faible risque. Actuellement, la prédiction du risque cardiovasculaire repose essentiellement sur le calcul du risque selon des équations mathématiques intégrant les principaux facteurs de risque (type Framingham) et des marqueurs de risque intermédiaires comme la mesure de l'EIMc. La maladie athéromateuse est générale, ce qui explique que des marqueurs morphologiques de la paroi carotidienne (épaisseur intima-média) ou fonctionnels de la paroi humérale (dysfonction endothéliale)



puissent être prédictifs de la survenue d'événements cardiovasculaires ultérieurs tant coronariens que cérébraux [158]. Même si ces paramètres sont de bons prédicteurs de la survenue des événements, la prédiction reste imparfaite.

La plaque d'athérosclérose connaît plusieurs stades évolutifs successifs: la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique et la plaque compliquée. Les plaques vulnérables sont le siège d'une activité inflammatoire significative comme en témoigne l'expression de l'activité des métalloprotéinases sécrétées essentiellement par des macrophages situés en périphérie du centre lipidique. Blankenberg et al. ont montré que la concentration plasmatique de MMP9 était un prédicteur de mortalité cardiovasculaire chez des patients coronariens [159]. L'activité inflammatoire détermine également l'intensité de l'apoptose des cellules de la plaque. La phosphatidylsérine (PS) anionique est redistribuée à la surface lors de l'apoptose cellulaire, conférant alors à la cellule une activité procoagulante. Des microparticules, dérivées des membranes cellulaires et riches en PS, sont produites en quantité importante dans les plaques athéromateuses. Elles déterminent en grande partie la thrombogénicité de la plaque. Des microparticules circulantes dérivées des cellules apoptotiques peuvent être détectées dans le sang périphérique. Mallat et al. ont montré chez des patients en angor instable une élévation significative de l'activité procoagulante des microparticules par rapport aux sujets en angor stable et aux contrôles non coronariens [160]. Les microparticules d'origine endothéliale étaient plus nombreuses chez les sujets en angor instable.

Parmi les méthodes disponibles pour évaluer les caractéristiques morpho-fonctionnelles des plaques athéromateuses, certaines sont invasives et donc non adaptées à la prévention (angiographie conventionnelle, échographie intra-artérielle, angioscopie, thermographie). Pour l'exploration des artères coronaires, le scanner permet d'éliminer l'existence d'une sténose significative sur les gros troncs coronaires et permet une caractérisation des plaques d'athérome. Il a été également démontré que la densité minimum

des plaques était significativement inférieure lors d'un syndrome coronarien aigu par rapport à l'angor stable et que la densité était plus faible au niveau de la lésion coupable qu'au niveau des autres lésions [161]. Pour l'étude des artères carotides, une étude a retrouvé une association 4 à 15 fois supérieure entre les plaques hypodenses détectées par le scanner et un antécédent d'AVC par rapport aux plaques isodenses [33]. Au niveau carotidien, actuellement, l'IRM est une technique non invasive prometteuse. Elle a l'avantage de pouvoir évaluer partiellement l'inflammation de la plaque et de différencier les composants lipidiques, collagéniques, thrombotiques et hémorragiques grâce à différentes séquences d'acquisition. Cai et al. ont montré que l'IRM carotidienne haute résolution multi-contraste réalisée avant une chirurgie carotidienne permettait de classer correctement 80% des lésions par rapport à l'analyse histologique [162]. L'épaisseur et la rupture de la cape collagène peuvent également être mises en évidence par l'IRM haute résolution. Yuan et al. ont retrouvé une forte association entre détection IRM de plaques dont la chape fibreuse est rompue et l'existence d'un AVC ischémique récent [163]. Une étude récente avec la rosuvastatine a montré qu'il était possible par IRM haute résolution multi-séquences de détecter les plaques possédant un cœur nécrotique riche en lipides et de mesurer la réduction de taille de ce cœur lipidique sous traitement [164].

Le risque cardiovasculaire des sujets diabétiques est augmenté par l'existence d'un syndrome métabolique associé. En 2001, le National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP) III a établi la définition du syndrome métabolique comme la présence d'au moins trois des critères suivants: tour de taille > 102 cm pour l'homme ou > 88 cm pour la femme, élévation des triglycérides  $\geq 1.5$  g/l, HDL-cholestérol bas < 0.4 g/l pour l'homme ou < 0.5 g/l pour la femme, hypertension artérielle  $\geq 130/85$  mm Hg ou traitée, élévation de la glycémie à jeûn 1.1 g/l [165]. La prévalence des coronaropathies, ajustée à l'âge, dans une population américaine de sujets âgés de plus de 50 ans, est de 8.7% en

l'absence de diabète et de syndrome métabolique, de 7,5% en cas de diabète sans syndrome métabolique, de 13,9% en cas de syndrome métabolique sans diabète avéré, de 19,2% en cas de diabète associé à un syndrome métabolique [166]. Cette élévation importante du risque cardiovasculaire en présence d'un syndrome métabolique, est liée à l'association de facteurs de risque indépendants qui composent ce syndrome. Il est également possible que le syndrome métabolique confère per se un risque supérieur à la somme des risques liés aux différents facteurs qui le composent, notamment par un effet médié par l'insulinorésistance et l'inflammation (élévation de la CRP et des cytokines pro-inflammatoires) [166]. Compte-tenu de cette hétérogénéité du risque vasculaire lors du diabète de type 2, il est pertinent de mieux repérer les sujets diabétiques ayant l'instabilité des plaques la plus élevée.

## **2.5 – Objectifs**

### **2.5.1 – Hypothèses de recherche**

L'hypothèse de recherche est de démontrer que les critères d'instabilité des plaques à l'imagerie et le degré d'altération des paramètres fonctionnels sont croissants parmi les populations étudiées avec un maximum chez les diabétiques de type 2 avec syndrome métabolique et événement récent.

L'hypothèse est donc d'identifier des sujets diabétiques de type 2 avec syndrome métabolique ayant un sur-risque vasculaire avec « athérome précritique », en supposant que les caractéristiques des plaques dans cette population sont similaires aux sujets ayant fait un événement récent.

### **2.5.2 – Objectif principal**

Mettre en évidence des différences dans l'aspect qualitatif des plaques athéromateuses carotidiennes ou coronariennes détectées par l'IRM haute résolution multi-séquences et le

scanner multibarrettes en fonction de l'existence d'un syndrome métabolique associé au diabète.

### **2.5.3 – Objectifs secondaires**

- Evaluer les modifications de la plaque carotidienne à la phase aigue d'un événement coronarien ou cérébral en comparant l'imagerie effectuée lors de cet événement et à distance;
- Relier les différences qualitatives des plaques à d'autres marqueurs intermédiaires de risque cardiovasculaire ou d'instabilité de la plaque (existence d'une dysfonction endothéliale, taux et origine des microparticules circulantes, concentration plasmatique de CRP et des métalloprotéinases);
- Evaluer les modifications dans l'origine cellulaire des microparticules en comparant les pourcentages observés lors de l'événement et à distance.

## **2.6 – Type d'étude**

Il s'agit d'une étude d'observation de cohorte, transversale monocentrique, sans bénéfice individuel direct, dans laquelle tous les patients bénéficient des mêmes examens. L'étude est conduite conformément aux lignes directives des Bonnes Pratiques Cliniques françaises et européennes et de la déclaration d'Helsinki, après avis du CCPPRB et recueil d'un consentement libre et éclairé.

## **2.7 – Critères d'évaluation**

### **2.7.1 – Principaux**

- Degré d'inflammation de la plaque en IRM: mesure relative de la variation de signal entre l'image acquise avant et après injection de gadolinium exprimée en pourcentage de rehaussement;
- Ratio volume des calcifications / volume global de la plaque;
- Volume des calcifications, et densité minimum des plaques (exprimée en unités Hounsfield, sans valeur seuil) au scanner multibarrettes.

### **2.7.2 – Secondaires**

- *Biologiques:*
  - concentration et origine des microparticules circulantes;
  - concentration plasmatique de métallo-protéinases et de CRP;
  - variation de l'origine cellulaire des microparticules lors d'un événement aigu et à distance.
- *Radiologiques:*
  - pourcentage de dilatation de l'artère humérale lors de l'épreuve d'hyperhémie;
  - variation des critères radiologiques d'évaluation principaux lors d'un événement aigu et à distance.

## **2.8 – Descriptif de la population étudiée**

### **2.8.1 – Sélection**

Compte tenu du caractère de faisabilité de cette étude et de l'absence de données similaires dans la littérature, il est prévu de façon empirique d'inclure 30 patients par groupe, soit 90 patients au total.

## 2.8.2 – Critères d'inclusion

- Patients hommes et femmes, âgés de 50 ans ou plus;
- Diabétiques (découverte du diabète après l'âge de 35 ans):
  - glycémie à jeûn à 2 reprises supérieure ou égale à 1.26 g/l;
  - ou glycémie supérieure ou égale à 2 g/l à la 2<sup>ème</sup> heure de l'HGPO;
  - ou traitement par antidiabétiques oraux et/ou insuline.
- Répondant aux critères d'éligibilité de l'un des 3 groupes suivants:
  - groupe I: groupe contrôle: patients diabétiques en prévention primaire sans syndrome métabolique:
    - + asymptomatiques: absence d'antécédents personnels coronariens ou cérébraux ischémiques, absence de symptomatologie évocatrice d'atteinte coronarienne ischémique, pouls périphériques présents, et ECG de repos normal;
    - + absence de syndrome métabolique associé au diabète.
  - groupe II: risque cardiovasculaire élevé: patients diabétiques en prévention primaire avec syndrome métabolique associé:
    - + asymptomatiques: absence d'antécédents personnels coronariens ou cérébraux ischémiques, absence de symptomatologie évocatrice d'atteinte coronarienne ischémique, pouls périphériques présents, et ECG de repos normal;
    - + présence d'au moins 3 des critères suivants: tour de taille > 102 cm pour l'homme ou > 88 cm pour la femme, élévation des triglycérides  $\geq$  1.5 g/l, HDL-cholestérol bas < 0.4 g/l pour l'homme ou < 0.5 g/l pour la femme, hypertension artérielle  $\geq$  130/85 mm Hg ou traitée.
  - groupe III: très haut risque cardiovasculaire avec athéromatose instable avérée: patients diabétiques en prévention cardiovasculaire secondaire (événement coronarien

ou cérébral récent datant de moins de 2 semaines), ayant ou non un syndrome métabolique associé:

+ Antécédents personnels d'infarctus du myocarde, d'angor avec atteinte coronarienne prouvée par la coronarographie, de pontages aorto-coronariens, d'angioplastie coronaire, d'insuffisance cardiaque d'origine ischémique, d'accident vasculaire cérébral ischémique.

- Et ayant au moins une plaque carotidienne (> 1.5 mm d'épaisseur et avec raccordement aigu à la paroi saine) à l'échographie (effectuée dans le cadre du suivi du diabète). La présence de la plaque carotidienne devra être confirmée, avant d'effectuer la mesure de la dysfonction endothéliale et les autres examens, par un écho-doppler avec mesure de l'épaisseur de la plaque et évaluation du degré de sténose.

### **2.8.3 – Critères d'exclusion**

- Diabète découvert avant l'âge de 35 ans;
- Corticothérapie orale d'une durée supérieure à 15 jours et arrêtée depuis moins de 3 mois;
- Refus de participer;
- Contre-indication à l'IRM (corps métalliques étrangers, claustrophobie) et au scanner (antécédents allergiques sévères aux agents de contraste iodés);
- Clairance de la créatinine calculée selon la formule de Cockcroft inférieure à 50 ml/min ou protéinurie supérieure à 1 g/l;
- Antécédents cardiovasculaires personnels datant de plus d'un mois : infarctus du myocarde, angor avec atteinte coronarienne prouvée par la coronarographie, pontages

aorto-coronariens, angioplastie coronaire, insuffisance cardiaque d'origine ischémique, accident vasculaire cérébral ischémique;

- Femmes enceintes;
- Sujets majeurs sous tutelle.

## **2.9 – Méthodologie**

### **2.9.1 – Déroulement pratique**

Les patients seront recrutés au sein de la Fédération d'endocrinologie sur le site de l'hôpital neuro-cardiologique ainsi que dans les services de cardiologie et neurologie du site neuro-cardiologique. Les patients pourront être inclus s'ils répondent aux critères d'inclusion et s'ils présentent une plaque carotidienne supérieure à 1.5 mm d'épaisseur et avec raccordement aigu à la paroi saine à l'écho-Doppler des TSA. Ils bénéficieront alors de façon séquentielle d'un prélèvement sanguin à jeûn suivi d'une mesure de la dysfonction endothéliale humérale, d'un scanner multibarrettes coronarien et carotidien et d'une IRM haute résolution multi-séquences carotidienne. Ces examens seront réalisés en ambulatoire pour les patients des groupes I et II. Pour les patients du groupe III, les examens pourront être effectués en ambulatoire ou en hospitalisation si la pathologie cardiovasculaire nécessite une hospitalisation supérieure à 48 heures après l'événement aigu.

Les patients du groupe III en prévention secondaire bénéficieront d'un prélèvement sanguin, d'une IRM et d'un scanner carotidiens de contrôle à 4 mois pour savoir si l'origine cellulaire des microparticules et les caractéristiques des plaques se modifient à distance de l'événement aigu. Ces examens seront également renouvelés pour les patients des groupes I et II à la phase aiguë d'un événement cardiovasculaire survenant dans l'année qui suivra l'inclusion. Les patients des groupes I et II seront contactés par téléphone tous les 3 mois pour



connaître leur statut cardiovasculaire. Les examens réalisés dans le cadre du suivi seront effectués en ambulatoire.

## **2.9.2 – Examens complémentaires**

### **2.9.2.1 – Dosages biologiques**

- *Prélèvement sanguin:*
  - veineux périphérique effectué le matin après 12 heures de jeûne et 20 minutes de repos allongé:
    - + dosage de la CRP (5ml);
    - + 2 prélèvements de 5ml sur tube citraté pour étude des fonctions coagulantes des microparticules et 2 tubes de 5ml pour détermination de l'origine cellulaire des microparticules;
    - + 1 tube de 5ml pour la détermination de la concentration de métallo-protéinase.
  
- *Microparticules circulantes:*
  - activité procoagulante: les microparticules plasmatiques seront isolées à partir de plasma déplaqueté par centrifugation. Elles seront fixées sur des microplaques préalablement coatées avec de l'annexine V. Leur activité procoagulante sera mesurée en quantifiant la thrombine générée à l'aide d'un substrat chromogénique. Les microparticules seront capturées par des anticorps spécifiques (anti-CD3, anti-CD11a, anti-CD146, et anti-GPIb) pour l'analyse de leur origine cellulaire par cytométrie de flux.
  
- *Matrix métallo-protéinase:*
  - la concentration plasmatique de MMP-9 sera effectuée par enzyme immunoassay (EIA) (kit commercial Fuji Chemicals, Japan).

### **2.9.2.2 – Mesure de la vasodilatation endothélium dépendante**

Elle sera effectuée à l'aide d'une sonde linéaire 8L5 sur plate-forme Sequoia S512. L'artère mesurée sera l'artère humérale, 2 à 10 cm au-dessus de la bifurcation en coupe longitudinale. Les images sont enregistrées sur un magnétoscope SVHS. Le sujet, à jeûn, reste allongé 20 minutes au repos. Les images de repos sont ensuite enregistrées pendant 2 minutes avec mesure du flux doppler pendant 15 secondes. Le brassard pédiatrique est gonflé à 5 cm au-dessous du pli du coude à 50 mm Hg au-dessus de la pression artérielle systolique (PAS) pendant 3 minutes. Les images de l'artère sont enregistrées de façon continue pendant les 3 minutes du garrot et pendant les 3 minutes suivantes. On enregistre la vitesse doppler comme ci-dessus dans les 15 premières secondes après dégonflage rapide. Le patient se repose 15 minutes. On reprend une nouvelle image de repos (pendant 2 minutes). On administre 300 µg de trinitrine sublinguale et on enregistre de nouvelles images 3 minutes après. L'ECG est monitoré sur l'échographe (repérage de l'onde R: télédiastole) et la tension artérielle (TA) est monitorée toutes les 2 minutes pendant la totalité de l'étude du membre supérieur controlatéral. Les critères d'évaluation seront le pourcentage de dilatation du vaisseau ( $= (\text{diamètre après vasodilatation} - \text{diamètre de repos}) \times 100 / \text{diamètre de repos}$ ) et le débit ( $= \text{vitesse au centre du vaisseau} \times \text{surface}$ ). Les résultats obtenus lors de l'étude d'hyperhémie seront comparés à ceux obtenus après administration de trinitrine (valeurs de référence).

### **2.9.2.3 – Echo-Doppler carotidien**

Echo-Doppler carotidien selon la méthode standard avec mesure de l'épaisseur de la plaque et évaluation du degré de sténose (critères NASCET, ECST, et doppler).

### **2.9.2.4 – IRM carotidienne**

Le protocole IRM (imageur 1.5 Tesla) consistera en l'acquisition de plusieurs séquences successives en apnée ou à l'aide d'un navigateur, d'une synchronisation cardiaque, et d'une antenne de surface carotidienne :

- séquences en densité de proton TSE double inversion-récupération black-blood (TR = 2000 ms, TE = 15 ms, épaisseur de coupe = 2 mm, résolution spatiale dans la coupe = 500x500 microns, temps d'acquisition = 20 secondes par coupe), orientation perpendiculaire à l'axe du vaisseau;
- séquences T2 TSE double inversion-récupération black-blood (TR = 2000 ms, TE = 50 ms, épaisseur de coupe = 2 mm, résolution spatiale dans la coupe = 500x500 microns, temps d'acquisition = 20 secondes par coupe), orientation perpendiculaire à l'axe du vaisseau;
- séquences T1 double inversion-récupération black-blood avant et après injection de 0.1 mmol/kg de gadolinium-DTPA (TR = 300 ms, TE = 15 ms, épaisseur de coupe = 2 mm, résolution spatiale dans la coupe = 500x500 microns, temps d'acquisition = 20 secondes par coupe). Les séquences acquises après injection de gadolinium seront acquises 2 minutes, 4 minutes, et 6 minutes après l'injection de gadolinium, orientation perpendiculaire à l'axe du vaisseau.

Les critères d'évaluation seront: l'inflammation de la plaque (une mesure relative de la variation de signal entre l'image acquise avant et après injection de gadolinium sera réalisée pour la plaque entière et éventuellement pour une partie de la plaque si le réhaussement est localisé en une zone bien spécifique) exprimée en pourcentage de réhaussement, le volume global de la plaque, le ratio volume des calcifications/volume global de la plaque, et le degré de sténose.

#### **2.9.2.5 – Scanner coronarien**

Une acquisition synchronisée à l'ECG centrée sur les axes carotidiens et coronariens sera réalisée après injection de produit de contraste iodé à l'aide d'un scanner multibarrettes. L'analyse comportera l'identification et la caractérisation des plaques sur les segments vasculaires explorés. Les critères d'évaluation seront: les calcifications, le caractère hypodense des plaques en unités Hounsfield (sans valeur seuil), le degré de sténose (significative si > 50%).

# **CHAPITRE 3 :**

## **ATHEROSCLEROSE, DIABETE DE TYPE 2 ET STEATOSE**

### **HEPATIQUE NON ALCOOLIQUE**

#### **1 – Données actuelles**

##### **1.1 – Significativité clinique**

La stéatose hépatique représente une entité anatomo-clinique majeure en raison notamment de l'intérêt croissant porté aux maladies stéatosiques non alcooliques du foie, regroupées sous l'acronyme anglo-saxon de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) [167], ainsi que de leur augmentation croissante. Ce groupe de maladies est très large puisqu'il va de la « simple » stéatose à la cirrhose en passant par la NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis). La stéatose correspond sur le plan biochimique à une accumulation de lipides dans les hépatocytes; il s'agit essentiellement de triglycérides. Une proportion importante de patients restera à ce stade de la maladie sans complication hépatique. Lorsque la stéatose s'accompagne d'une inflammation avec une nécrose et une fibrose péri-sinusoïdale et/ou portale, on parle de stéatohépatite non alcoolique (NASH). Le pronostic sera très différent entre la stéatose simple et la NASH. Le risque de cirrhose et de mortalité d'origine hépatique est significativement plus élevé en cas de NASH [168]. La cirrhose et le risque de carcinome hépatocellulaire sont les éléments pronostics de la NASH. Ce risque est mal évalué. La plupart des études avec biopsies hépatiques sont réalisées chez des malades et il existe un biais de recrutement évident. Par ailleurs, les études à partir d'autopsies ne permettent pas d'avoir une évaluation correcte de la consommation alcoolique. Malgré ces différents biais, il

semble que la prévalence de la stéatose soit de l'ordre de 10% chez les individus à poids normal et de 70% chez les obèses, et que la stéatohépatite soit retrouvée chez 3% des sujets non obèses et chez 15 à 20% des sujets obèses [169]. Au stade initial du diagnostic, 30 à 40% des sujets porteurs d'une stéatohépatite ont une fibrose avancée, dont 10 à 15% de cirrhose [169,170].

L'accumulation de triglycérides intra-hépatocytaires s'accompagne d'une augmentation du taux des transaminases. L'augmentation des transaminases n'est pas associée de façon systématique à la sévérité de l'atteinte hépatique. Dans le cas du diabète sucré, il a été constaté qu'à niveau de stéatose identique, les transaminases sont plus basses que chez les patients non diabétiques [171]. Il semble donc que le taux de transaminases sous-estime le niveau de stéatose des patients diabétiques. Des patients porteurs d'une stéatose évoluée peuvent présenter des taux de transaminases normaux. Les études à partir de biopsies hépatiques montrent que les patients avec stéatose sont habituellement d'âge moyen (49-54 ans), en surpoids ou obèses (60-90%), hypertriglycéridémiques (27-81%) et diabétiques de type 2 (28-55%) [172].

La prévalence de la stéatose au cours du diabète de type 2 est variable selon les études et surtout selon le mode de diagnostic utilisé pour confirmer la stéatose. On estime que 25 à 75% des patients diabétiques sont porteurs d'une stéatose [11]. Dans un travail prospectif, Hickman et al. [173] ont montré que 28% des patients diabétiques de type 2 présentaient une anomalie du bilan hépatique, avec pour 65% d'entre eux une stéatose, 14% une infection virale, et 12.6% une hépatopathie d'origine alcoolique. En utilisant la technique non-invasive de référence qui est la spectrométrie-RMN, la prévalence de la stéatose (> 5%) est estimée à 34% dans la population générale américaine [174]. Avec cette même technique, différentes équipes ont trouvé que 60 à 76% des patients diabétiques de type 2 avaient une stéatose [175,176]. Ainsi dans un travail récent, 144 patients porteurs d'une stéatohépatite confirmée à

la biopsie ont bénéficié d'une évaluation complète pour déterminer les caractéristiques clinico-biologiques associées à une fibrose sévère [177]. Vingt-six pourcent n'avaient pas de fibrose anormale, 47% une fibrose minimale ou modérée, 10% une fibrose sévère et 17% une cirrhose. En analyse multivariée, l'âge, l'obésité, un ratio ASAT/ALAT >1 et la présence d'un diabète sucré étaient des facteurs de risque indépendants de fibrose sévère [177].

## **1.2 – Caractéristiques anatomo-physio-pathologiques**

Pour des raisons de simplicité, nous assimilerons le terme « NAFLD » au terme « stéatose » dans les paragraphes à venir même si ces deux termes représentent sémantiquement deux entités différentes. Le terme « stéatose simple » sera employé le cas échéant.

### **1.2.1 – Possibles mécanismes biologiques reliant stéatose et athérosclérose accélérée**

Bien que le risque plus élevé de maladie cardiovasculaire associé à la stéatose puisse être parfaitement expliqué par l'association étroite de la stéatose avec les facteurs de risque métaboliques constituant le syndrome métabolique, les données récentes provenant des études transversales et prospectives supportent l'hypothèse que la stéatose elle-même contribue à un risque plus élevé de maladie cardiovasculaire indépendamment des autres facteurs de risque pronostiques. Cela suggère une idée plus complexe des interrelations entre stéatose, syndrome métabolique et athérosclérose. Les mécanismes biologiques possibles liant stéatose et athérosclérose accélérée sont encore mal connus.

La stéatose dans ses formes les plus avancées pourrait agir comme un stimulus augmentant la résistance à l'insuline et la dyslipidémie (avec une surproduction caractéristique de particules rémnantes riches en triglycérides et en cholestérol), conduisant à

une athérosclérose accélérée. Cette hypothèse est supportée par la relation étroite et linéaire existante entre le contenu hépatique en graisse et les mesures directes de la sensibilité hépatique à l'insuline [178], et ceci est aussi en partie validée par les études prospectives démontrant que l'augmentation des enzymes hépatiques prédit la présence d'un diabète de type 2 indépendamment de l'obésité [179-181].

Un autre mécanisme sous-jacent liant possiblement la stéatose à l'athérosclérose peut être représenté par une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation chronique préclinique, qui sont reconnus comme des facteurs de causalité dans la progression de la simple stéatose à des formes plus avancées de stéatose [182,183]. Les espèces d'oxygène réactive dérivées de l'oxydation des acides gras stimulée par la stéatose, les lésions hépatiques et le relargage des cytokines qui s'en suivent, et le contexte proinflammatoire qui en découle pérennisent probablement les dégâts hépatiques de la stéatose et ajoutent des stimuli athérogènes supplémentaires au statut oxydatif/proinflammatoire déjà élevé en rapport étroit avec le syndrome métabolique [184], notamment par l'augmentation de la production hépatique de CRP. Il a été rapporté que les patients avec stéatose ont des marqueurs plasmatiques de stress oxydatif [185,186] et d'inflammation plus élevés [186-188] que ceux qui n'ont pas de stéatose. La plupart de ces marqueurs inflammatoires sont associés à la sévérité histologique de la stéatose indépendamment des facteurs de risque classiques et des facteurs constituant le syndrome métabolique.

La diminution des concentrations d'adiponectine, une cytokine sécrétée par le tissu adipeux et possédant des propriétés anti-athérogènes [187], pourrait représenter un autre mécanisme possible reliant stéatose et athérosclérose. Il existe chez les patients stéatosiques une diminution marquée des concentrations plasmatiques d'adiponectine [187,189,190], et cette diminution est associée à la sévérité histologique de la stéatose indépendamment de l'obésité abdominale et des autres constituants du syndrome métabolique [187,190,191]. Cette



observation peut être pertinente puisque l'hypoadiponectinémie est un facteur prédictif indépendant de maladie cardiovasculaire et de syndrome métabolique dans les grandes études prospectives [192], et pourrait également contribuer directement au développement et à la progression de la stéatose. En effet, il a été montré que l'administration d'adiponectine recombinante est efficace pour améliorer l'hépatomégalie associée à l'obésité et l'infiltration graisseuse hépatique chez les souris ob/ob [193]. Les mécanismes potentiels par lesquels l'adiponectine peut exercer ses actions hépato-protectrices incluent l'induction de l'oxydation hépatique des acides gras, l'inhibition de la synthèse des acides gras, et la suppression de la production du TNF-alpha dans le foie [193].

Enfin, il existe aussi de nombreux arguments laissant penser que la stéatose pourrait être liée à une athérosclérose accélérée à travers la présence d'un métabolisme anormal des lipoprotéines, notamment durant la phase post-prandiale [194,195]. Il a été montré que la magnitude de la réponse des triglycérides post-prandiaux et des diènes conjugués aux LDL après un test oral de charge en graisse est plus élevée chez les patients avec stéatose que chez les sujets sains, et qu'elle est étroitement corrélée à la sévérité des lésions hépatiques histopathologiques [194,195].

### **1.2.2 – Physiopathologie de la stéatose du diabétique de type 2**

Le contenu hépatique en triglycérides est déterminé par la concentration d'acides gras libres circulants, leur bêta-oxydation, la lipogenèse de novo et la sécrétion des VLDL-triglycérides. La stéatose résulte d'un déséquilibre entre la synthèse des lipides et leur oxydation. Parmi les mécanismes à l'origine de ce déséquilibre, on retrouve la diminution de l'oxydation des acides gras libres, secondaire à une dysfonction mitochondriale, et une augmentation de la lipogenèse. Des travaux récents suggèrent qu'une atteinte de la diacylglycérol acyl transférase (DGAT) pourrait être un élément important à l'origine de la

stéatose [196]. Plusieurs études ont montré le rôle majeur de la DGAT dans la synthèse et la sécrétion des triglycérides sous forme de VLDL. La surexpression de certaines formes de la DGAT chez l'animal conduit à la stéatose sans développement d'insulinorésistance [197]. Les modèles animaux ont montré que d'autres acteurs du métabolisme lipidique sont impliqués dans l'apparition d'une stéatose, c'est le cas de SREBP-1c (sterol response element binding protein), de PPAR gamma et de chREBP (carbohydrate response element binding protein) [197]. Une baisse de la sortie des triglycérides sous forme de VLDL est un autre mécanisme en cause. Ainsi, dans le cas des patients diabétiques, un polymorphisme de la MTP (microsomal transfert triglyceride protein), enzyme impliquée dans la synthèse et la sécrétion hépatique des VLDL, est associé à une plus grande prévalence de la stéatose [198]. L'apparition de lésions inflammatoires et dégénératives entraîne le passage de la stéatose à la NASH. Il est favorisé par une augmentation du stress oxydatif et par un déséquilibre de la sécrétion de certaines adipokines (adiponectine, leptine, TNF alpha, résistine). Les patients diabétiques de type 2, porteurs d'une insulino-résistance, réunissent la plupart des conditions favorables au développement d'une stéatose, voire d'une NASH, avec une augmentation de la concentration des acides gras libres plasmatiques, une obésité viscérale responsable d'anomalies de la sécrétion des adipokines, des troubles de la lipogenèse et une augmentation du stress oxydatif.

### **1.3 – Rôle de l'imagerie non invasive in vivo**

#### **1.3.1 – Diagnostic et quantification de la stéatose**

L'évaluation diagnostique de la stéatose est un challenge majeur. La plupart des patients stéatosiques n'ont pas de symptômes ou de signes cliniques de maladie hépatique au moment du diagnostic, même si quelques patients rapportent parfois une fatigue et une

sensation d'inconfort abdominal. Une hépatomégalie peut être la seule anomalie à l'examen clinique chez la plupart des patients. La présence d'une élévation plasmatique modérée du taux des enzymes hépatiques est la plus fréquente et souvent la seule anomalie biologique retrouvée chez les patients avec stéatose. D'autres anomalies biologiques peuvent être retrouvées chez les patients présentant des formes plus avancées de stéatose (stade de cirrhose). Cependant, comme précédemment décrit, le taux des enzymes hépatiques peut être dans les limites de la normale chez une grande partie de ces patients, jusqu'à 70%, et possède donc une mauvaise sensibilité pour la détection de la stéatose [182,199]. Les patients avec un taux d'enzymes hépatiques normal peuvent recouvrir tout l'éventail des lésions histologiques de la stéatose. Par conséquent, la présence d'un taux d'enzymes hépatiques normal ne peut pas être utilisée pour exclure la présence de formes plus avancées de maladie hépatique [182,199,200]. La quantification de la stéatose représente donc un enjeu majeur. L'analyse histologique d'une biopsie hépatique est considérée comme l'examen de référence, mais cette technique est invasive, peu précise (semi-quantitative) même s'il est possible de réaliser une morphométrie, et sujette à des biais d'échantillonnage dus à l'hétérogénéité de la stéatose [201,202]. Plusieurs techniques non invasives ont été développées pour évaluer la stéatose. L'échographie hépatique est la plus utilisée. Elle permet la détection de la stéatose avec une sensibilité de 83% et une spécificité voisine de 100% [169]. Cependant, l'échographie permet de détecter la stéatose, mais pas de la quantifier de façon précise. Par ailleurs, sa sensibilité est plus mauvaise pour les stéatoses modérées, notamment quand l'infiltration graisseuse hépatique est inférieure à 33% en histologie [182,199]. Le scanner avec injection de produit de contraste permet d'avoir une évaluation semi-quantitative de la stéatose. Sa sensibilité oscille entre 54 et 71%, mais il a l'inconvénient d'être irradiant. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H-SRM}$ ) est actuellement reconnue comme la technique non invasive de référence pour quantifier la stéatose [203], même si sa validation reste

incomplète dans la littérature. En 2004, cette technique a été utilisée pour mesurer la stéatose dans une cohorte de plus de 2000 sujets [174]. Un seuil de 5.5% a été défini comme limite supérieure de la normale. Une stéatose hépatique a été diagnostiquée chez 34% de la population américaine [174]. Cependant, cette technique très précise est encore peu disponible et nécessite un appareillage adapté et un paramétrage complexe pour donner des résultats fiables qui ne permettent pas sa généralisation en pratique clinique. Des techniques plus simples se sont donc développées en IRM ayant toutes comme point commun d'utiliser la propriété de décalage chimique entre les protons de l'eau et de la graisse. L'IRM avec séquence phase-opposition de phase est une technique simple, bien corrélée à la spectroscopie-RMN, et donne une évaluation quantitative très précise de la stéatose [176]. Cette technique, applicable en routine clinique, nécessite un temps d'acquisition court et permet de réaliser une véritable cartographie (imagerie paramétrique) de la stéatose hépatique, grâce notamment à une séquence écho de gradient (EG) triple-écho [176,204]. Nous nous sommes attachés à développer cette technique rapide de mesure de la stéatose hépatique à 3 Teslas et à la valider par rapport à la spectroscopie-RMN. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications internationales, l'une dans « *Radiology* », et l'autre dans « *European Radiology* » (Annexes E et F) [176,204].

Concernant le niveau de stéatohépatite, la biopsie hépatique reste la référence. L'utilisation de biomarqueurs à partir de paramètres biologiques et cliniques est en cours d'évaluation. Selon le score utilisé, l'indice de masse corporelle, le tour de taille, les transaminases, la glycémie, les paramètres lipidiques sont intégrés dans le calcul de l'évaluation du niveau de stéatohépatite. Toutefois, on peut craindre que leur utilisation soit délicate dans la population des patients diabétiques, car beaucoup des paramètres biologiques et cliniques pris en compte sont modifiés par la maladie diabétique et par les traitements des facteurs de risque vasculaire. Une autre technique d'évaluation de la fibrose est l'élastométrie.

Cette technique à base d'ultrasons semble bien validée chez le sujet à poids normal; par contre les patients obèses comme les diabétiques sont difficiles à évaluer par cette méthode du fait de l'épaisseur de leur panicule adipeux.

### **1.3.2 – Stéatose et maladies cardiovasculaires chez le non diabétique et le diabétique de type 2**

Nous nous proposons dans les paragraphes à venir de résumer les principales données de la littérature concernant les relations entre stéatose, athérosclérose carotidienne et/ou coronarienne, et diabète de type 2.

#### **1.3.2.1 – Liens entre stéatose et complications vasculaires du diabète**

Les relations entre stéatose et maladie diabétique ne sont pas très bien connues. L'absence de technique fiable, non invasive, d'évaluation de la stéatose explique le peu d'études disponibles sur le sujet.

La présence d'une stéatose et d'une NASH dans la population générale est associée à un plus grand risque de pathologie coronarienne [6,7,9]. Par ailleurs, la stéatose est fortement liée au syndrome métabolique qui associe insulino-résistance, troubles glucidiques, anomalies lipidiques, et obésité androïde, reconnus comme associés à une augmentation du risque cardiovasculaire [5]. La difficulté est donc de déterminer si cette relation stéatose/risque vasculaire est indépendante des anomalies métaboliques accompagnant la stéatose hépatique. Dans la population de patients diabétiques, l'évaluation de la relation stéatose/risque vasculaire a donné des résultats discordants. L'équipe italienne de Targher a retrouvé une augmentation des événements coronariens chez les sujets diabétiques avec stéatose évaluée par échographie [8]. A l'inverse, dans un travail récent, avec une évaluation plus précise de la

stéatose par scanner, il n'a pas été retrouvé d'augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne en cas de stéatose chez les diabétiques de type 2 [10].

Concernant une éventuelle influence de la stéatose sur les complications microvasculaires du diabète de type 2, seule une étude a observé une augmentation de l'incidence des traitements de rétinopathie par laser et de la présence d'une néphropathie (15% versus 9%) chez les sujets diabétiques atteints de stéatose [205]. Un travail récent démontre qu'en cas de prédiabète, la présence d'une stéatose est associée à une plus grande incidence de microalbuminurie [206]. Ces auteurs suggèrent que la présence de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation du stress oxydant en cas de stéatose favoriseraient le développement des complications microvasculaires du diabète. Les limites de ces études résident dans l'utilisation de l'échographie pour le diagnostic d'une surcharge hépatique modérée en graisse et la non prise en compte de l'obésité viscérale, qui est associée aux complications microvasculaires du diabète. Des études complémentaires sont indispensables pour vérifier si l'augmentation des complications microvasculaires en présence de stéatose est réellement indépendante de l'influence de l'obésité viscérale.

### **1.3.2.2 – Liens entre stéatose et marqueurs d'athérosclérose préclinique**

Des études transversales récentes ont démontré de manière répétitive une augmentation nette de l'EIMc, comme indice fiable d'athérosclérose préclinique [207] chez les patients stéatosiques [6,208,209]. Ces données ont été validées par les résultats d'une étude de population démontrant une augmentation de l'EIMc et une prévalence plus élevée de plaques carotidiennes chez les patients stéatosiques [210]. Cependant, dans ces études le diagnostic de stéatose était basé exclusivement sur les tests sanguins et l'échographie, mais

n'était pas confirmé par biopsie hépatique, qui est la méthode de référence pour confirmer la stéatose [182,183,211].

Récemment, l'équipe de Targher [7] a montré dans une grande étude observationnelle que les patients avec stéatose prouvée par biopsie avaient une augmentation significative de l'EIMc en comparaison avec des sujets sains contrôles d'âge, de sexe, et d'IMC identiques; l'EIMc était significativement plus élevée pour les individus avec NASH que pour ceux avec une simple stéatose, et plus important, la sévérité histologique de la stéatose (c'est-à-dire stéatose, nécrotico-inflammation et fibrose) prédisait l'EIMc indépendamment des facteurs de risque classiques, de l'insulinorésistance estimée par le modèle HOMA (Homeostatic Model Assessment), et des constituants du syndrome métabolique. Précédemment, O'Leary et al. [212] rapportaient qu'une valeur d'EIMc  $\leq 0.86$  mm entraîne un risque faible de maladie cardiovasculaire, alors qu'une valeur d'EIMc  $\geq 1.10$  mm entraîne un risque élevé de maladie cardiovasculaire. Il mérite de souligner que les valeurs moyennes d'EIMc que Targher et al. retrouvaient chez les patients contrôles sains et ceux avec stéatose étaient de 0.82 et 1.14 mm, respectivement [7]. Sookoian et al. [9], dans une méta-analyse récente, confirment ces données chez 3 497 sujets (1 427 patients et 2 070 sujets contrôles), en montrant une association significative entre EIMc et stéatose. Comme nous l'avons dit précédemment, si cette association ne fait aucun doute chez les patients stéatosiques non diabétiques, elle est beaucoup plus controversée chez les patients stéatosiques diabétiques de type 2, aucune étude n'ayant réellement démontré cette association. Nous avons notamment montré dans une population de 101 patients diabétiques de type 2 et stéatosiques [213], chez lesquels la mesure de la stéatose était réalisée de manière quantitative et donc très précise par spectro-IRM, qu'il n'y avait pas de différence significative de l'EIMc chez les patients stéatosiques et non stéatosiques, suggérant l'intérêt majeur de la mesure par IRM de la stéatose et l'existence potentielle de polymorphismes génétiques sous-jacents pouvant moduler les liens entre

stéatose et EIMc. C'est ce que nous avons montré dans le travail suivant chez 218 diabétiques de type 2 stéatosiques [214]. Nous avons démontré que la relation existante entre EIMc et stéatose chez le diabétique était différente en fonction du polymorphisme de l'adiponutrine, expliquant possiblement les résultats discordants de la littérature concernant les liens entre stéatose et athérosclérose dans cette population. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications internationales dans « *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* » (Annexes G et H) [213,214].

Il existe également des preuves supplémentaires démontrant que la stéatose est corrélée avec la dysfonction circulatoire endothéliale, un autre marqueur d'athérosclérose précoce [215]. Il a été montré qu'il existe chez les patients non diabétiques stéatosiques une diminution significative de la vasodilatation endothéliale artérielle brachiale médiée par le flux en comparaison avec les sujets contrôles sains identiques, et que cette diminution est corrélée aux aspects histologiques de la stéatose indépendamment de l'âge, du sexe, de l'IMC, de l'insulinorésistance évaluée par HOMA, et des autres constituants du syndrome métabolique [216]. De plus, la probabilité à 10 ans de risque d'événements cardiovasculaires (calculée selon l'équation de Framingham) était modérément augmentée chez ces patients [216]. De manière similaire, chez les patients diabétiques de type 2 métaboliquement bien contrôlés, une augmentation légère du taux d'enzymes hépatiques, comme marqueur de stéatose, était indépendamment associé à une diminution de la vasodilatation artérielle brachiale médiée par le flux et à une mauvaise sensibilité à l'insuline corps entier [217].

Evidemment, ces données soulèvent la question de savoir si les événements cardiovasculaires apparaîtront avant le développement d'une insuffisance hépatique chez les patients avec stéatose, et si un traitement agressif des facteurs de risque cardiovasculaires est une modalité thérapeutique importante pour tous les patients stéatosiques.



### **1.3.2.3 – Liens entre stéatose et prévalence des maladies cardiovasculaires**

Targher et al. [218] ont récemment rapporté une augmentation de la prévalence des événements cardiovasculaires coronariens, cérébrovasculaires et vasculaires périphériques chez les patients diabétiques de type 2 avec stéatose (diagnostiquée par tests sanguins et échographie) en comparaison avec des patients diabétiques non stéatosiques. La relation significative entre stéatose et maladie cardiovasculaire était peu affectée par l'ajustement aux facteurs de risque classiques, la durée du diabète et le contrôle glycémique, mais l'ajustement au syndrome métabolique atténuait cette relation. Dans une étude plus récente des mêmes auteurs analysant 2 839 patients diabétiques de type 2 [219], la stéatose était associée à une prévalence significativement plus élevée de maladies cardiovasculaires coronaires (26.6 vs 18.3%), cérébrovasculaires (20 vs 13.3%) et périphériques (15.4 vs 10%) comparé aux patients non stéatosiques.

De la même manière, dans un large échantillon de travailleurs mâles d'âge moyen, ceux avec stéatose étaient plus susceptibles d'avoir une maladie cardiovasculaire en comparaison avec ceux sans stéatose; de plus, la présence d'une stéatose était associée à la présence d'une maladie cardiovasculaire indépendamment de l'obésité et des autres facteurs pronostiques [220].

De manière similaire, Kessler et al. [221] rapportaient une prévalence de la stéatose significativement plus élevée chez les patients avec IDM (66 et 50% pour les hommes et les femmes, respectivement) que dans la population générale. De plus, la présence d'une stéatose était associée avec une sévérité plus marquée de maladie coronaire. Ces deux données étaient indépendantes de l'âge, du sexe et de l'IMC.

Encore plus intéressant, dans une autre étude par Schwimmer et al. [222] ont émis l'hypothèse que la stéatose était un FDR d'apparition précoce de lésions d'athérosclérose et

que l'athérosclérose débute dans l'enfance et progresse jusqu'à l'âge adulte pour former les lésions responsables d'événements cardiovasculaires. Ils ont donc analysés les données autopsiques de 817 enfants (âgés de 2 à 19 ans) décédés d'autres causes (accident, homicide, suicide). La graisse hépatique, définie comme > 5% d'hépatocytes affectés par la stéatose, était présente dans 15% des cas, une athérosclérose modérée des artères coronaires était présente dans 21% des cas, et une athérosclérose plus sévère était présente chez 2% des sujets. Les lésions athéroscléreuses étaient plus fréquentes chez les enfants stéatosiques que chez ceux sans stéatose (odds ratio 1.8,  $p < 0.001$ ). Les auteurs concluaient que la graisse hépatique n'était peut-être pas seulement un marqueur mais aussi un médiateur précoce de l'athérosclérose.

Dans une méta-analyse récente, Sookoian et al. [9] montraient, dans une population incluant au total 3 212 sujets, que la présence de plaques carotidiennes était plus fréquente chez les patients avec stéatose que chez les patients contrôles. De la même manière, Assy et al. [223] viennent récemment d'évaluer la relation existante entre stéatose et maladie coronaire chez 29 patients stéatosiques et 32 sujets contrôles. La stéatose était évaluée par scanner et la maladie coronaire par angioscanner 64-barrettes. Les auteurs retrouvaient une prévalence significativement plus élevée de plaques coronaires calcifiées et non calcifiées, et de sténoses coronaires non significatives chez les patients stéatosiques. Par ailleurs, la stéatose était un facteur prédictif majeur d'athérosclérose coronaire (odds ratio, 2 ;  $p < 0.04$ ), indépendamment des indicateurs de syndrome métabolique. A l'opposé de ces études, nous avons montré de manière prospective dans une population de 144 diabétiques de type 2 qu'un contenu hépatique en graisse élevé mesuré par spectro-IRM prédisait l'absence de plaque d'athérosclérose carotidienne (odds ratio, 0.94; 95% confidence interval, 0.89-0.99;  $p = 0.017$ ). Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans « *Diabetic Medicine* » (Annexe I) [224].

Evidemment, tout lien de cause à effet doit être fait de manière précautionneuse compte tenu du caractère transversal de ces études. Des études complémentaires de suivi sont nécessaires pour déterminer si l'augmentation de la prévalence de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires parmi les patients stéatosiques affecte également la mortalité à long terme, et surtout pour déterminer si cette prévalence est modifiée chez les patients stéatosiques et diabétiques de type 2 en fonction des polymorphismes génétiques et de méthodes plus précises d'évaluation de la stéatose comme l'IRM.

#### **1.3.2.4 – Liens entre stéatose et incidence des maladies cardiovasculaires**

Les patients stéatosiques apparaissent avoir un risque de mortalité augmenté en comparaison avec la population générale [182]. Par exemple, dans une cohorte de 420 patients stéatosiques, Adams et al. [225] rapportaient un taux global de mortalité élevé au terme d'un suivi moyen de 7.6 ans en comparaison avec la population générale, et ce taux était principalement en rapport avec des maladies cardiovasculaires et néoplasiques. Un âge plus élevé et la présence d'un diabète de type 2 et d'une cirrhose, mais pas le syndrome métabolique, prédisaient indépendamment la mortalité globale parmi les patients stéatosiques. Matteoni et al. [168] rapportaient que le taux de mortalité par maladie cardiovasculaire était la deuxième cause la plus commune de décès chez 132 patients stéatosiques suivis pendant 18 ans, avec un taux égalant celui des décès de cause hépatique et suivant de près celui des décès par cancer. Antérieurement, Lee et al. [170] rapportaient que les maladies cardiovasculaires étaient la cause la plus fréquente de décès chez 49 patients suivis pendant 4 ans.

Cependant, il est important de souligner que les études existantes examinant l'histoire naturelle de la stéatose sont limitées par les nombres de patients relativement petits, et sont

issues de centres tertiaires spécialisés, limitant donc la généralisation à la communauté extérieure [182].

Suite à cela, quelques grandes études épidémiologiques prospectives ont montré de fortes associations entre une élévation modérée du taux des enzymes hépatiques, comme marqueur présumé de stéatose, et une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires aussi bien chez les patients non diabétiques que chez les diabétiques de type 2. Parmi 7 613 hommes britanniques d'âge moyen suivis pendant 11.5 ans, une élévation des taux de gamma GT était indépendamment associé à une augmentation significative des décès de toutes causes et notamment par maladie cardiovasculaire [226]. Dans une étude de 163 944 hommes et femmes autrichiens, les taux de gamm GT étaient indépendamment associés à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire dans les deux genres [227]. Ioannou et al. [228] ont réalisé une analyse transversale comparant 7 526 participants de la « National Health and Nutrition Examination Survey-III » avec des taux normaux et élevés d'alanine aminotransférase (ALAT), et ont examiné les niveaux moyens du score de Framingham pour le risque coronaire. Ils rapportaient que les sujets avec élévation du taux plasmatique d'ALAT, en l'absence d'hépatite virale et de consommation alcoolique excessive, avaient un risque calculé de maladie cardiovasculaire augmenté, sachant que la plupart avaient une stéatose. Récemment, Schindhelm et al. [229] ont rapporté une forte association positive entre le taux plasmatique d'ALAT et l'incidence de maladie coronaire dans une large cohorte de caucasiens d'âge moyen. Les auteurs ont démontré que les sujets avec augmentation modérée du taux d'ALAT avaient un risque augmenté d'événements coronaires à venir pendant un suivi moyen de 10 ans, indépendamment des FDR classiques et des constituants du syndrome métabolique. Au contraire, l'association des taux d'ALAT avec les décès de toutes causes devenait non significative après ajustement pour les mêmes facteurs pronostiques.

Targher et al. [230] ont mené une étude prospective chez 2 103 patients diabétiques de type 2 sans maladie cardiovasculaire ni hépatite virale connues. Durant 5 ans de suivi, 248 participants ont développés une maladie coronaire non fatale (IDM et procédures de revascularisation coronaire) ou un accident ischémique cérébral ou sont décédés de mort cardiovasculaire. Par un jeu d'échantillonnage du risque, 496 patients contrôles parmi ceux qui restaient indemnes de maladie cardiovasculaire pendant le suivi étaient sélectionnés par randomisation (ratio 2:1), et appareillés pour l'âge et le sexe aux sujets « cas ». Les auteurs ont trouvé que la stéatose, diagnostiquée par tests sanguins et échographie hépatique, était significativement associée à une augmentation modérée du risque d'incidence de maladie cardiovasculaire, même après ajustement pour les FDR classiques, le contrôle glycémique, et les composants du syndrome métabolique. Récemment, Adams et al. [231] ont montré dans une étude de cohorte de 337 patients diabétiques de type 2 dont 116 stéatosiques suivis pendant 10.5 ans que la présence d'une stéatose était significativement associée à une augmentation du risque de mortalité globale toutes causes confondues, mais n'était pas associée à une augmentation du risque de mortalité par maladie cardiovasculaire dans l'analyse multivariée ajustée. La principale cause de mortalité était d'origine hépatique. Ces données alimentent donc la controverse sur la spécificité du risque cardiovasculaire chez les patients stéatosiques et diabétiques de type 2 de manière concomitante, ce risque n'étant pas augmenté ici dans cette population contrairement à ce qui a été rapporté chez les patients stéatosiques non diabétiques.

Autrement dit, si certains des résultats sus-cités supportent l'hypothèse que les patients stéatosiques ont un risque augmenté de maladies cardiovasculaires, cette hypothèse semble moins évidente et plus controversée chez les patients stéatosiques diabétiques de type 2. Actuellement, chez le patient non diabétique, rien ne permet de savoir si le fait de traiter la stéatose peut prévenir le développement de maladies cardiovasculaires. Cependant, les

interventions connues pour être efficaces dans la prévention des maladies cardiovasculaires, incluant la perte de poids [232] et les traitements par les agents sensibilisants à l'insuline (metformine et glitazones) [233,234] ou les traitements hypolipémiants (statines) [235] pourraient possiblement améliorer la stéatose.

## **2 – Protocole GEPSAD**

Ci-dessous un descriptif détaillé du protocole GEPSAD qui a donné lieu à cinq publications internationales sur le thème « Imagerie de l'athérosclérose chez le sujet diabétique de type 2 et/ou stéatosique non alcoolique » (Annexes E, F, G, H et I).

### **2.1 – Titre**

Intitulé du protocole: étude GEPSAD ou « GENetic Polymorphisms, Steatosis And Diabetes » (ou polymorphismes génétiques, stéatose hépatique et anomalies lipidiques chez les sujets diabétiques de type 2).

### **2.2 – Promoteur**

Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, 1 bd Jeanne D'Arc, BP 77908, 21079 Dijon Cedex.

### **2.3 – Investigateur principal**

Monsieur le Professeur Jean-Michel PETIT; Service d'Endocrinologie et de Diabétologie, CRI INSERM U866, CHU Le Bocage, 2 bd du Maréchal de Lattre de Tassigny, BP 77908, 21079 Dijon Cedex; Tél: 03.80.29.34.53; Fax: 03.80.29.35.19; E-mail: jean-michel.petit@chu-dijon.fr.

## 2.4 – Contexte scientifique

La stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD représente la 1<sup>ère</sup> cause d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux avec une prévalence estimée entre 10 et 24% de la population générale [236,237]. Fréquemment associée à une insulino-résistance et indépendamment du surpoids, la stéatose hépatique non alcoolique est récemment devenue un des éléments du syndrome d'insulino-résistance [238]. Dans 20 à 30% des cas, elle peut s'associer à des lésions nécrotico-inflammatoires avec ou sans fibrose définissant alors une stéatohépatite non alcoolique ou NASH. Alors que la stéatose pure est d'évolution bénigne, la NASH est une hépatopathie potentiellement grave susceptible d'évoluer vers la fibrose dans plus de 50% des cas, et la cirrhose dans 15% avec risque d'hépatocarcinome [236]. Les facteurs prédictifs de la fibrose dans la NASH ont fait l'objet de 3 études rétrospectives chez des patients biopsiés pour anomalies des tests hépatiques. Les paramètres indépendants étaient l'âge, l'index de masse corporelle, l'activité ALAT, le ratio ALAT/ASAT >1, l'existence d'une hypertriglycéridémie, et l'existence d'un diabète [177,239,240]. Cependant, leurs valeurs prédictives médiocres incitent à rechercher d'autres marqueurs.

Les études à partir de biopsies hépatiques montrent que 28 à 55% des patients porteurs d'une NASH ont un diabète de type 2 [241]. La stéatose hépatique chez les sujets diabétiques, s'accompagne d'une sévérité de la dyslipidémie avec une élévation du taux des triglycérides, une diminution du taux des HDL et un enrichissement des VLDL en triglycérides [242]. Ce travail récent suggère que la stéatose hépatique serait un meilleur indice de prédiction de la dyslipidémie dans le diabète de type 2 que l'hyperglycémie ou l'insulino-résistance. Les mécanismes à l'origine de cette stéatose sont encore très mal connus. L'implication de modifications des taux d'adipocytokines à l'origine des stéatoses, quel qu'en soit l'origine, est une hypothèse intéressante mais encore insuffisante [243,244]. Si l'influence de facteurs

génétiques de prédisposition est acceptée, les études sur ce sujet sont peu nombreuses et utilisent souvent des évaluations de la stéatose avec des techniques peu performantes comme l'échographie. Ainsi, le polymorphisme 493 G/T de la Microsomal Transfer Protein (MTP) a été reconnu comme un facteur de risque de stéatose mais seulement à partir d'études échographiques de la surcharge en graisse [245]. L'étude de ces polymorphismes de prédisposition est donc indispensable afin de mieux préciser les sujets diabétiques à risque de développer une stéatose et cela dans le but de leur proposer en priorité une prise en charge préventive comme les traitement par glitazones ou par d'autres drogues actuellement en cours d'évaluation comme le rimonabant, un agoniste des récepteurs endocannabinoïdes.

On ne connaît pas exactement le nombre de patients diabétiques porteurs d'une stéatose. Les études à partir d'évaluations échographiques estiment entre 50 et 70% le nombre de sujets diabétiques atteints de stéatose [246]. Mais l'évaluation échographique est beaucoup moins précise que l'étude par biopsie hépatique ou par spectrométrie RMN. L'évolution de la maladie diabétique en présence d'une stéatose est-elle différente de celle d'un sujet diabétique sans stéatose? De nombreuses questions concernant les sujets diabétiques de type 2 stéatosiques restent sans réponse: ces patients présentent-ils une maladie diabétique plus évolutive? Existe-t-il des facteurs génétiques de prédisposition? Ont-ils plus de complications micro et macrovasculaires? Présentent-ils un diabète plus difficile à équilibrer? Existe-t-il des anomalies biologiques et notamment lipidiques associées à la présence de la stéatose?

Il paraît donc indispensable de mieux évaluer les mécanismes à l'origine de la stéatose, et ses conséquences biologiques, notamment sur des analyses fines du métabolisme lipidique. La prise en charge de la stéatose des sujets diabétiques n'a pas fait l'objet d'études importantes et cela probablement en raison de l'absence d'évaluation de son impact réel sur la morbidité et la mortalité associées à la maladie diabétique. Toutefois, certaines thérapeutiques



hypoglycémiantes comme les glitazones provoquent une diminution de la concentration plasmatique de certaines adipocytokines et une diminution significative de la surcharge hépatique en graisse. On peut donc formuler l'hypothèse de privilégier en première intention ce type de traitement chez les diabétiques porteurs d'une stéatose si on démontre le caractère péjoratif de cette dernière sur l'évolution de la maladie diabétique.

## **2.5 – Objectifs**

### **2.5.1 – Hypothèses de recherche**

L'hypothèse de recherche est donc de démontrer qu'un certain nombre de polymorphismes génétiques de protéines impliquées dans le métabolisme glucidique, lipidique et adipocytaire (polymorphismes MTP, -493 G/T de la MTP, -1927 C/T du récepteur R1 de l'adiponectine et -265 C/T du gène de l'apolipoprotéine A-II) sont des facteurs favorisant le développement d'une stéatose en cas de diabète de type 2. Le but est également d'évaluer de façon plus approfondie les anomalies lipidiques associées à la présence d'une stéatose et notamment celles qui concernent l'expression monocytaire des récepteurs des LDL. L'hypothèse formulée est que la stéatose hépatique s'accompagne d'une activation de facteurs de transcription impliqués dans la lipogénèse et notamment les facteurs SREBP. L'activation de ces facteurs pourrait provoquer une augmentation de l'expression de récepteurs des LDL à l'origine d'une augmentation du catabolisme des LDL. Nous pensons que les modifications biologiques associées à la stéatose (stress oxydant, altérations de la sécrétion des adipocytokines, modifications du métabolisme lipidique) sont des facteurs qui pourraient expliquer une augmentation des complications micro et macrovasculaires de ces sujets.

### **2.5.2 – Objectif principal**

Etudier les polymorphismes génétiques susceptibles de favoriser l'apparition d'une stéatose chez les patients diabétiques de type 2.

### **2.5.3 – Objectifs secondaires**

- Préciser la physiopathologie des anomalies lipidiques associées à la stéatose chez les patients diabétiques de type 2;
- Evaluer les complications micro et macrovasculaires des sujets porteurs d'une stéatose en comparaison avec les sujets diabétiques de type 2 non stéatosiques.

### **2.6 – Type d'étude**

Il s'agit d'une étude d'observation de cohorte, transversale monocentrique, sans bénéfice individuel direct, dans laquelle tous les patients bénéficient des mêmes examens. L'étude est conduite conformément aux lignes directives des Bonnes Pratiques Cliniques françaises et européennes et de la déclaration d'Helsinki, après avis du CCPPRB et recueil d'un consentement libre et éclairé.

### **2.7 – Critères d'évaluation**

#### **2.7.1 – Principaux**

Détermination de l'existence d'une stéatose hépatique mesurée par spectrométrie RMN (variable continue) dans une population de patients diabétiques de type 2 chez laquelle on aura déterminé les polymorphismes génétiques de gènes d'intérêt du métabolisme lipidique, glucidique et adipocytaire, -493 G/T de la MTP, -1927 C/T du récepteur R1 de l'adiponectine et -265 C/T du gène de l'apolipoprotéine A-II (variables qualitatives).

### **2.7.2 – Secondaires**

Mesure de l'expression monocyttaire des récepteurs LDL (cytométrie en flux) et mesure des taux plasmatiques de LDL-oxydés (ELISA), mesure de l'EIMc, évaluation de la présence de complications microvasculaires du diabète sucré dans le cadre du bilan annuel systématique (microalbuminurie, rétinographie non mydriatique, score clinique de neuropathie).

## **2.8 – Descriptif de la population étudiée**

### **2.8.1 – Sélection**

Les patients diabétiques de type 2 sont préalablement vus en consultation médicale de suivi. A cette occasion, ils sont sélectionnés et le protocole d'étude leur est proposé. Au cours de cette visite, l'information sur la mise en place et les objectifs de la recherche est donnée au sujet (lecture et remise de la note d'information au sujet). Si le sujet accepte son inclusion dans le protocole, le bilan annuel de suivi effectué en hôpital de jour ou en hospitalisation complète comprendra une étude de la surcharge hépatique en spectro-IRM et le prélèvement de 2 tubes de sang supplémentaires. Tous les traitements pouvant modifier la surcharge hépatique en graisse (glitazones, corticoïdes systémiques, immunosuppresseurs) sont interdits. Le nombre de patients prévu est de 205.

### **2.8.2 – Critères d'inclusion**

- Patient diabétique de type 2;
- Patient ayant donné son consentement écrit;
- Patient affilié à un régime de sécurité sociale.

### **2.8.3 – Critères d'exclusion**

- Pacemaker (contre-indication à l'IRM);
- Diabète de type 1;
- Patient traité par glitazones dans les 3 mois précédant l'inclusion;
- Consommation d'alcool quotidienne supérieure à 4 verres par jour.
- Présence de matériel implantable (contre-indication à l'IRM);
- Claustrophobie;
- Patient < 18 ans;
- Patient sous tutelle ou curatelle ou non autonome intellectuellement.

## **2.9 – Méthodologie**

### **2.9.1 – Déroulement pratique**

Au décours d'une consultation dans le service d'endocrinologie, les patients diabétiques de type 2, programmés pour bilan de diabète en hospitalisation de jour dans le service, se verront proposer de rentrer dans l'étude. Après information et signature du consentement éclairés, les patients diabétiques de type 2 après recueil des données cliniques bénéficieront du bilan biologique standard réalisé de façon systématique aux patients de ce type (dosage de: glycémie à jeun, HbA1c, ASAT, ALAT, gamma-GT, PAL, bilirubinémie, protidémie, albuminémie, cholestérol total, HDL-cholestérol, triglycérides, VS, CRP, fibrinogène, INR, TP-TCK, ECBU, microalbuminurie).

En plus du bilan biologique systématique, 3 tubes supplémentaires seront prélevés de façon à rechercher le polymorphisme génétique de 3 protéines (Microsomal Transfer Protein, Adiponectin receptor-1, Apolipoprotein A-II).

Les patients bénéficieront également d'une consultation diététicienne, d'une consultation infirmière (éducation), d'une surveillance de la tension artérielle par MAPA pendant 1h30, d'une surveillance des glycémies capillaires au cours de la journée, d'un ECG,

d'un examen ophtalmologique, d'une spectro-IRM pour rechercher la présence d'une stéatose hépatique, d'une mesure de l'épaisseur intima-média et d'une consultation de synthèse.

## **2.9.2 – Examens complémentaires**

### **2.9.2.1 – Dosages biologiques**

- *Microsomal Transfer Protein (MTP): polymorphisme (-493 G/T):*

La MTP est une protéine de transfert des lipides active au niveau intracellulaire. Elle est produite au niveau du foie et de l'intestin. La MTP est indispensable à la production de lipoprotéines à apo-B (par exemple les VLDL) par ces deux organes. En effet, elle permet l'assemblage des VLDL dans le réticulum endoplasmique en transférant des molécules lipidiques (triglycérides, cholestérol) vers l'apoprotéine B initialement non lipidée. Un déficit génétique en MTP (abetalipoprotéïnémie) se traduit par l'absence de sécrétion de lipoprotéines à apo-B et par une accumulation massive de lipides au niveau du foie et de l'intestin [247]. Le polymorphisme que nous souhaitons étudier (-493 G/T) est situé sur le promoteur de la MTP et est associé avec une production diminuée de MTP (diminution de l'expression du gène). Il a été décrit comme associé à des stéatoses dans un certain nombre de situations [248].

- *Adiponectin Receptor-1: polymorphisme (-1927 C/T):*

L'adiponectine est une cytokine produite par le tissu adipeux (adipocytokine) qui sensibilise l'organisme à l'action de l'insuline (effet antidiabétique). Elle agit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques adipo-R1 et adipo-R2 exprimés notamment au niveau hépatique [249]. Une diminution de l'expression des récepteurs à l'adiponectine a été observée chez des patients souffrant de stéatose hépatique. De plus, le polymorphisme que

nous souhaitons étudier (-1927 C/T) touchant le récepteur adipo-R1 a été associé a une diminution de la sensibilité à l'insuline et à un risque accru de stéatose hépatique [250].

- *Apolipoprotein A-II: polymorphisme (-265 C/T):*

L'apoprotéine A-II, est une protéine produite par le foie et présente dans le plasma sanguin associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Ses fonctions biologiques sont encore à l'heure actuelle imparfaitement caractérisées. Néanmoins, en inhibant la lipase hépatique, elle est susceptible de moduler secondairement l'approvisionnement du foie en acides gras et donc son contenu en triglycérides [251]. Le polymorphisme que nous souhaitons étudier (-265 C/T) à été associé à une diminution de l'expression de l'apo-A-II [252].

### **2.9.2.2 – IRM hépatique**

- *Généralités:*

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) a commencé au milieu des années 80 [253-255]. Cependant, son utilisation concernant les organes intra-abdominaux a été plus tardive que pour le cerveau en raison des problèmes techniques liés aux artéfacts d'origine respiratoire et aux mouvements péristaltiques de l'intestin. Le bruit ainsi généré pouvait être en partie corrigé par l'apnée et la position en procubitus, comme l'ont montré certaines études [256,257]. Les études concernant la stéatose hépatique ont souvent utilisé l'échographie pour l'évaluer dans la mesure où le foie stéatosique est plus hyperéchogène [258,259]. La SRM constitue aujourd'hui un moyen fiable et surtout non invasif de mesurer la stéatose hépatique et plusieurs études ont démontré l'excellente corrélation avec la biopsie hépatique [257,260,261]. Une étude récente avec un nombre très important de patients a également utilisé cette modalité [262]. Dans une étude publiée dans en 2005 [263], les auteurs

confirment la capacité de mesurer les lipides intra-hépatocytaires en SRM et trouvent également une relation étroite entre ces lipides et l'adiposité globale.

- *Protocole d'acquisition:*

- séquences en apnée:

- + IRM Trio TIM (Siemens, Erlangen, Germany) 3.0 Tesla;

- + antenne phased-array;

- + patient en décubitus dorsal;

- + localizer;

- + T2 HASTE (TE = 51 ms, TR =  $\infty$ ) couvrant la totalité du foie en coupes axiales sans Fat-Sat;

- + 2 séquences T1 FLASH 2D phase/opposition de phase (out-phase: TE = 1.24 ms, in-phase: TE = 4.92 ms, alpha = 60° puis la même avec alpha = 20°);

- + T1 FLASH 2D double-écho phase/phase (TE1 = 2.48 ms, TE2 = 4.92 ms);

- + T1 FLASH 2D axial in-phase sur le disque L4-L5.

- spectro-RM (SRM) monovoxel:

- + shim automatique sur chaque voxel en observant le pic de l'eau;

- + 4 séquences « PRESS » en apnée (temps d'acquisition = 18 secondes): voxel = 2\*2\*2cm choisis en 2 points dans le foie (lobe gauche, lobe droit), chaque voxel est choisi afin d'éviter les gros vaisseaux, la vésicule biliaire et les régions graisseuses sous-cutanées ou rétropéritonéales ou mésentériques (TE = 30 ms, TR = 3000 ms, 16 acquisitions, spectral width = 1000 Hz), 2048 data points avec une séquence sans suppression d'eau (pour permettre la correction de phase) et une séquence avec suppression d'eau (3 impulsions de saturation sélective avec une bandwidth de 50 Hz).

+ 2 séquences « PRESS » en 2 respirations libres: voxel = 2\*2\*2cm choisis en 2 points dans le foie (lobe gauche, lobe droit), chaque voxel est choisi afin d'éviter les gros vaisseaux, la vésicule biliaire et les régions graisseuses sous-cutanées ou rétropéritonéales ou mésentériques (TE = 30 ms, TR = 3000 ms, 64 acquisitions, spectral width = 1000 Hz), 2048 data points avec une séquence sans suppression d'eau (pour permettre la correction de phase) et une séquence avec suppression d'eau (3 impulsions de saturation sélective avec une bandwidth de 50 Hz).

- *Post-traitement:*

- détermination du T2\* par la méthode 2-points et calcul du rapport de signal ((in-phase)-(out-phase))/(in-phase):

+ à l'aide du viewer intégré aux consoles Siemens Leonardo;

+ puis, 4 ROIs dans le foie (les mêmes et de taille semblable, en utilisant la fonction copier/coller sur les images phase/phase ou phase/opposition de phase) en évitant les structures vasculaires, la vésicule, la graisse sous-cutanée, mésentérique ou rétropéritonéale;

+ de même: 2 ROIs sur la rate, 2 ROIs sur le tissu graisseux sous-cutané, 2 ROIs (si possible) sur la graisse rétropéritonéale, 2 ROIs sur les muscles paravertébraux, 2 ROIs sur le rachis, 2 ROIs le pancréas, 2 ROIs sur le rein au niveau cortical et au niveau médullaire, 1 ROI en dehors du patient (bruit).

- calcul d'image (in-phase)-(out-phase)/(in-phase):

+ analyse du pourcentage de chute de signal par cartographie visuelle.

- épaisseur graisse sous-cutanée:



- + mesure de l'épaisseur, en mm, de graisse sous-cutanée de la paroi abdominale antérieure sur la coupe axiale correspondant à l'origine de l'artère mésentérique supérieure.
- évaluation de la graisse totale:
  - + à partir de la séquence FLASH 2D à l'étage L4-L5 en coupe axiale, segmentation de la graisse sous-cutanée, rétro-péritonéale, intra-péritonéale et comparaison aux mesures normales :  $308 \text{ cm}^2 \pm 97$ ,  $52 \text{ cm}^2 \pm 18$ ,  $118 \text{ cm}^2 \pm 48$ .
- volumétrie hépatique:
  - + contourage du foie sur chaque coupe axiale de la séquence T2 HASTE, calcul de la surface hépatique sur chaque coupe, multipliée par l'espace inter-coupes. La somme obtenue correspond au volume hépatique.
- spectres:
  - + après correction de la phase et de la ligne de base, et en tenant compte des facteurs de correction liés au T1 et au T2 des métabolites;
  - + la stéatose hépatique est une variable continue correspondant à un pourcentage et calculée en faisant le rapport de l'intégrale du pic de lipides (CH2 1.30 ppm) et du pic de l'eau (4.77 ppm).

### **2.9.2.3 – Echographie carotidienne**

- *Généralités:*

Le but est de traduire de manière la plus reproductible possible la rigidité artérielle en mesurant l'EIMc. L'EIMc, qui est en moyenne de 0.7 mm entre 50 et 60 ans, augmente

physiologiquement avec l'âge, de 0.005 à 0.01 mm/an selon les études. L'EIMc est étroitement liée aux facteurs de risque:

- l'HTA (surtout systolique) est sans doute l'un des facteurs les plus déterminants. Les hypertendus ont en moyenne une EIMc plus élevée de 0.06 à 0.25 mm que les normotendus;
- l'hypercholestérolémie (HDL et LDL) majore l'EIM (de 0.13 mm en moyenne);
- le tabac (majoration de 0.05 à 0.1 mm);
- le diabète (majoration de 0.05 à 0.08 mm);
- antécédents familiaux de coronaropathie précoce;
- ainsi que d'autres facteurs de risque: hyperhomocystéinémie, résistance à l'insuline, index de masse corporelle (IMC), anticorps antiphospholipides;
- l'EIMc est par ailleurs en corrélation avec les marqueurs inflammatoires tels que la CRP;
- les antihypertenseurs (IEC, bêta-bloquants, inhibiteurs calciques, et ARA II) ainsi que les statines agissent sur l'EIM en la réduisant ou en ralentissant sa progression.

- *Protocole:*

L'EIMc est mesurée en mode B haute résolution (HDI 5000, Philips) avec une sonde linéaire multifréquence (5-12 MHz). La procédure est réalisée par un seul radiologue expérimenté et entraîné à l'imagerie vasculaire ultrasonore. Celui-ci est aveugle concernant les données cliniques et paracliniques. Les 2 artères carotides communes sont examinées en coupes antéro, postéro et médiolatérales et la distance (en mm) entre les 2 lignes hyperéchogènes est mesurée (la ligne interne représentant l'interface intimale et la ligne externe représentant l'interface média-adventice). Le point de référence est le début de la

dilatation du bulbe carotidien (perte du parallélisme des bords). L'EIMc moyenne est calculée à partir des 6 mesures effectuées pour chaque patient.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous nous sommes attachés dans ce travail de thèse à résumer les concepts récents sur les particularités physiopathologiques et radiologiques de l'athérosclérose carotidienne et/ou coronarienne chez les sujets non diabétiques et diabétiques de type 2, en fonction de l'existence ou non d'une stéatose hépatique non alcoolique. Nous avons notamment démontré l'intérêt des techniques d'imagerie non invasives classiques dans la mise en exergue de ces particularités et dans la stratégie de dépistage et de prévention des complications de l'athérosclérose dans ces différentes populations.

La première partie de cette thèse a consisté à démontrer la performance du scanner multibarrettes multisites en un temps, en regard des techniques de référence, dans la conduite du bilan étiologique des infarctus cérébraux, et d'une séquence d'IRM modifiée pour l'amélioration du contraste intraplaque à l'étage carotidien.

La seconde partie a permis d'évaluer l'apport du coroscanner dans la détection de la maladie coronaire et la stratification du risque d'événement coronaire chez des sujets diabétiques de type 2, aussi bien asymptomatiques que symptomatiques.

Enfin, la troisième et dernière partie nous a permis de montrer l'importance de l'évaluation du risque cardiovasculaire chez les patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique. Le développement d'une technique simple et non invasive de mesure de la stéatose en IRM et l'évaluation échographique de l'athérosclérose carotidienne avec mesure de l'épaisseur intima-média ont notamment permis de mettre en exergue un certain rôle protecteur de la stéatose contre l'athérosclérose carotidienne chez les patients diabétiques de type 2, contrairement aux sujets non diabétiques.

L'influence de la surcharge hépatique en graisse sur le risque de complications vasculaires, spécifiquement chez le diabétique, nécessite cependant d'être évaluée à plus grande échelle et par des études longitudinales de suivi. Nos résultats méritent également d'être confirmés au niveau des autres sites classiques et importants d'athérosclérose tels que les artères coronaires et les artères de jambes. La poursuite de l'exploitation des données de l'étude GEPSAD devrait confirmer ou infirmer ces résultats à l'étage jambier. L'acquisition locale d'un nouveau scanner multibarrettes pour l'étude des artères coronaires devrait aussi nous permettre de poursuivre notre travail dans ce sens avec comme perspective le même type d'étude pour l'évaluation de l'influence de la stéatose hépatique sur le risque cardiovasculaire chez les patients diabétiques de type 1.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006;113:e85-151.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
3. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-74.
4. Leutenegger M, Bertin E. Diabetes mellitus and atherosclerosis. Physiopathology of diabetic macroangiopathy. *Rev Med Interne* 1995;16:31-42.
5. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:27-38.
6. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1045-50.
7. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Relation between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006;29:1325-30.
8. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:2119-21.

9. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008;49:600-7.
10. McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, et al. Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3029-35.
11. Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care* 2007;30:734-43.
12. Bonnet J. Atherosclerosis. *EMC-Cardiologie Angéiologie* 2005;2:436-58.
13. Duriez P. Mechanisms of formation of atheroma plaque. *Rev Med Interne* 2004;25:S3-6.
14. Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque: current imaging methods and new perspectives. *Stroke* 2005;36:2764-72.
15. Weber JR. Left ventricular hypertrophy: its prime importance as a controllable risk factor. *Am Heart J* 1988;116:272-9.
16. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis* 2004;18:346-9.
17. Graf S, Garipey J, Massonneau M, et al. Experimental and clinical validation of arterial diameter waveform and intimal media thickness obtained from B-mode ultrasound image processing. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:1353-63.
18. Burke GL, Evans GW, Riley WA, et al. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke* 1995;26:386-91.
19. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in



- older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14-22.
20. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *Am J Epidemiol* 1997;146:483-94.
  21. Hollander M, Hak AE, Koudstaal PJ, et al. Comparison between measures of atherosclerosis and risk of stroke: the Rotterdam Study. *Stroke* 2003;34:2367-72.
  22. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, et al. American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography); Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention; Society of Cardiovascular Computed Tomography. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain; a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). *Circulation* 2007;115:402-26.
  23. Rumberger JA, Brundage BH, Rader DJ, Kondos G. Electron beam computed tomographic coronary calcium scanning: a review and guidelines for use in asymptomatic persons. *Mayo Clin Proc* 1999;74:243-52 [Erratum in: *Mayo Clin Proc* 1999;74:538].
  24. Bild DE, Detrano R, Peterson D, et al. Ethnic differences in coronary calcification: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* 2005;111:1313-20.
  25. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 1995;273:1421-8.

26. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998;351:1379-87.
27. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1998;339:1415-25.
28. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
29. Wasserman BA, Wityk RJ, Trout HH 3rd, Virmani R. Low-grade carotid stenosis: looking beyond the lumen with MRI. *Stroke* 2005;36:2504-13.
30. Hamon M, Biondi-Zoccai GG, Malagutti P, et al. Diagnostic performance of multislice spiral computed tomography of coronary arteries as compared with conventional invasive coronary angiography: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1896-910.
31. Leber AW, Becker A, Knez A, et al. Accuracy of 64-slice computed tomography to classify and quantify plaque volumes in the proximal coronary system: a comparative study using intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:672-7.
32. Schroeder S, Kopp AF, Baumbach A, et al. Noninvasive détection and évaluation of atherosclerotic coronary plaques with multislice computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1430-5.
33. Serfaty JM, Nonent M, Nighoghossian N, et al. Plaque density on CT, a potential marker of ischemic stroke. *Neurology* 2006;66:118-20.
34. Walker LJ, Ismail A, McMeekin W, Lambert D, Mendelow AD, Birchall D. Computed tomography angiography for the évaluation of carotid atherosclerotic plaque: correlation with histopathology of endarterectomy specimens. *Stroke* 2002;33:977-81.

35. Iriart X, Brunot S, Coste P, et al. Early characterization of atherosclerotic coronary plaques with multidetector computed tomography in patients with acute coronary syndrome: a comparative study with intravascular ultrasound. *Eur Radiol* 2007;17:2581-8.
36. Boussel L, Cakmak S, Wintermark M, et al. MDCT of heart, extra- and intracranial arteries in etiological workup of ischemic stroke. *Radiology* 2010;In Press.
37. Yuan C, Mitsumori LM, Ferguson MS, et al. Accuracy of in vivo coronary plaque morphology assessment: a validation study of in vivo virtual histology compared with in vitro histopathology. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2405-12.
38. Zhao XQ, Yuan C, Hatsukami TS, et al. Effects of prolonged intensive lipid-lowering therapy on the characteristics of carotid atherosclerotic plaques in vivo by MRI: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1623-9.
39. Botnar RM, Perez AS, Witte S, et al. In vivo molecular Imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent. *Circulation* 2004;109:2023-9.
40. Yuan C, Kerwin WS, Ferguson MS, et al. Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *J Magn Reson Imaging* 2002;15:62-7.
41. Kerwin W, Hooker A, Spilker M, et al. Quantitative magnetic resonance imaging analysis of neovasculature volume in carotid atherosclerotic plaque. *Circulation* 2003;107:851-6.
42. Wasserman BA, Smith WI, Trout HH 3rd, Cannon RO 3rd, Balaban RS, Arai AE. Carotid artery atherosclerosis: in vivo morphologic characterization with gadolinium-enhanced double-oblique MR imaging initial results. *Radiology* 2002;223:566-73.

43. Kawahara I, Morikawa M, Honda M, et al. High-resolution magnetic resonance Imaging using gadolinium-based contrast agent for atherosclerotic carotid plaque. *Surg Neurol* 2007;68:60-5.
44. Kerwin WS, O'Brien KD, Ferguson MS, Polissar N, Hatsukami TS, Yuan C. Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: a dynamic contrast-enhanced MR Imaging study. *Radiology* 2006;241:459-68.
45. Boussel L, Herigault G, Sigovan M, Loffroy R, Canet-Soulas E, Douek P. Modified electrocardiograph-triggered black-blood turbo spin-echo technique to improve T1-weighting in contrast-enhanced MRI of atherosclerotic carotid arteries. *J Magn reson Imaging* 2008;28:533-7.
46. Hyafil F, Laissy JP, Mazighi M, et al. Ferumoxtran-10-enhanced MRI of the hypercholesterolemic rabbit aorta : Relationship between signal loss and macrophage infiltration *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:176-81.
47. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, et al. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107:2453-8.
48. Schmidt R, Breteler MMB, Inzitari D, Fratiglioni L, Hofman A, Launer LJ. Prognosis with stroke in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 2000;54:S34-S37.
49. Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge initiale des patients adultes atteints d'accident vasculaire cérébral – Aspects médicaux – ANAES Septembre 2002.
50. Lovett JK, Coull AJ, Rothwell PM. Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies. *Neurology* 2004;62:569-73.
51. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxfordshire Community Stroke Project--

- 1981-86. 2. Incidence, case fatality rates and overall outcome at one year of cerebral infarction, primary intracerebral and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:16-22.
52. Nederkoorn PJ, Mali WPTHM, Eikelboom BC, et al. Preoperative diagnosis of carotid artery stenosis accuracy of noninvasive testing. *Stroke* 2002;33:2003-8.
53. Nonent M, Serfaty JM, Nighoghossian N, et al., for the CARMEDAS Study Group. Concordance rate differences of 3 noninvasive imaging techniques to measure carotid stenosis in clinical routine practice. Results of the CARMEDAS Multicenter Study. *Stroke* 2004;35:682-6.
54. Erickson SJ, Mewissen MW, Foley WD, et al. Stenosis of the internal carotid artery: assessment using color Doppler imaging compared with angiography. *AJR* 1989;152:1299-1305.
55. The French Study of Aortic Plaques in Stroke Group Atherosclerotic Disease of the Aortic Arch as a Risk Factor for Recurrent Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 1996;334:1216-21.
56. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002;287:2570-81.
57. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1266-71.
58. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, et al. The impact of diabète mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. *Arch Intern Med* 2001;161:1717-23.
59. Drouet L, Bal dit Sollier C, Vermillet A, Henry P. Type 2 diabetes and atherothrombosis. *Arch Cardiovasc Dis* 2008;101:9-15.

60. Ait-Oufella H, Tedgui A. Atherosclerosis and diabetes. *Arch Cardiovasc Dis* 2008;101:3-8.
61. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
62. Mood GR, Bavry AA, Roukoz H, Bhatt DL. Meta-analysis of the role of statin therapy in reducing myocardial infarction following elective percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2007;100:919-23.
63. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008;371:117-25.
64. Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:378-84.
65. Assmann G, Gotto AM Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III18-14.
66. De Vries R, Borggreve SE, Dullaart RP. Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab* 2003;49:601-13.
67. Plutzky J, Medicine. PPARs as therapeutic targets: reverse cardiology? *Science* 2003;302:406-7.
68. Marx N, Froehlich J, Siam L, et al. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:283-8.

69. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006;116:1071-80.
70. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation* 2004;109:1750-5.
71. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515-81.
72. Ait-Oufella H, Poursmail V, Simon T, et al. Defective mer receptor tyrosine kinase signaling in bone marrow cells promotes apoptotic cell accumulation and accelerates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1429-31.
73. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103:773-8.
74. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8264-8.
75. Carantoni M, Abbasi F, Chu L, et al. Adherence of mononuclear cells to endothelium in vitro is increased in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1997;20:1462-5.
76. Kunt T, Forst T, Fruh B, et al. Binding of monocytes from normolipidemic hyperglycemic patients with type 1 diabetes to endothelial cells is increased in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:252-6.
77. Desfait AC, Serri O, Renier G. Normalization of plasmal lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor-alpha production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care* 1998;21:487-93.

78. Ichikawa K, Yoshinari M, Iwase M, et al. Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients. *Atherosclerosis* 1998;136:281-7.
79. Rao PM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;101:234-47.
80. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999;48:855-64.
81. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9052-7.
82. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol* 1997;151:1085-95.
83. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, et al. Atorvastatine reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999;147:253-61.
84. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003;93:1159-69.
85. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597-605.



86. Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for Advanced glycation end products. *Nat Med* 1998;4:1025-31.
87. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
88. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93-102.
89. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;44:349-56.
90. Tayebjee MH, Lip GY, MacFayden RJ. What role do extracellular matrix changes contribute to the cardiovascular disease burden of diabetes mellitus? *Diabet Med* 2005;22:1628-35.
91. Marfella R, Di Filippo C, Baldi A, et al. The vascular smooth muscle cells apoptosis in asymptomatic diabetic carotid plaques: role of glycemic control. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2118-20.
92. Falk E, Thim T, Kristensen IB. Atherosclerotic plaque, adventitia, perivascular fat, and carotid Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009;2:183-6.
93. Tan KT, Tayebjee MH, Lim HS, Lip GY. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabet Med* 2005;22 1657-62.
94. Gresele P, Guglielmini G, De Angelis M, Ciferri S, et al. Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1013-20.
95. Liu D, Maier A, Scholze A, et al. High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via

- phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:746-51.
96. Dellas C, Schafer K, Rohm IK, et al. Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases Cgamma2 and A2. *Thromb Haemost* 2007;98:1063-71.
  97. Takahashi S, Ushida M, Komine R, et al. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin. *Thromb Res* 2007;119:517-24.
  98. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241-7.
  99. Brown AS, Hong Y, de Belder A, et al. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:802-7.
  100. Zuberi BF, Akhtar N, Afsar S. Comparison of mean platelet volume in patients with diabetes mellitus, impaired fasting glucose and non-diabetic subjects. *Singapore Med J* 2008;49:114-6.
  101. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Insulin resistance, haemostatic and inflammatory markers and coronary heart disease risk factors in type 2 diabetic men with and without coronary artery disease. *Diabetologia* 2004;47:1557-65.
  102. Balasubramanian V, Vele O, Nemerson Y. Local shear conditions and platelet aggregates regulate the incorporation and activity of circulating tissue factor in ex-vivo thrombi. *Thromb Haemost* 2002;88:822-6.

103. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:2166-71.
104. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106:2442-7.
105. Sambola A, Osende J, Hathcock J, et al. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003;107:973-7.
106. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840-5.
107. Morel O, Jesel L, Hugel B, et al. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* 2003;1:171-7.
108. Rafail S, Ritis K, Schaefer K, et al. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNFalpha involvement. *Thromb Res* 2008;122:366-75.
109. Napoleone E, Di Santo A, Amore C, et al. Leptin induces tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells: a possible link between obesity and cardiovascular risk? *J Thromb Haemost* 2007;5:1462-8.
110. Dunn EJ, Ariens RA, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia* 2005;48:1198-1206.
111. Dunn EJ, Philippou H, Ariens RA, Grant PJ. Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006;49:1071-80.

112. Carr ME, Martin EJ, Kuhn JG, Spiess BD. Onset of force development as a marker of thrombin generation in whole blood : the thrombin generation time (TGT). *J Thromb Haemost* 2003;1:1977-83.
113. Pieters M, Covic N, van der Westhuizen FH, et al. Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes - a purified fibrinogen model. *Thromb Haemost* 2008;99:691-700.
114. Bastelica D, Morange P, Berthet B, et al. Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:173-8.
115. Alessi MC, Bastelica D, Mavri A, et al. Plasma PAI-1 levels are more strongly related to liver steatosis than adipose tissue accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1262-8.
116. Fontbonne A. Insulin-resistance syndrome and cardiovascular complications of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 1996;22:305-13.
117. Ishihara M, Kojima S, Sakamoto T, et al., Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators. Usefulness of combined white blood cell count and plasma glucose for predicting in-hospital outcomes after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006;97:1558-63.
118. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med* 2002;162:1182-9.
119. Petrauskiene V, Falk M, Waernbaum I, Norberg M, Eriksson JW. The risk of venous thromboembolism is markedly elevated in patients with diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1017-21.

120. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 128;1998:262-9.
121. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997;96:1432-7.
122. Holaj R, Spacil J, Petrasek J, Malik J, Haas T, Aschermann M. Intima-media thickness of the common carotid artery is the significant predictor of angiographically proven coronary artery disease. *Can J Cardiol* 2003;19:670-6.
123. Mitsuhashi N, Onuma T, Kubo S, Takayanagi N, Honda M, Kawamori R. Coronary artery disease and carotid artery intima-media thickness in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002;25:1308-12.
124. Teno S, Uto Y, Nagashima H, et al. Association of postprandial hypertriglyceridemia and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23:1401-6.
125. Guvener N, Tutuncu NB, Oto A, Erbas T. Major determinants of the carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients: age and body mass index. *Endocr J* 2000;47:525-33.
126. Yamamoto M, Egusa G, Yamakido M. Carotid atherosclerosis and serum lipoprotein(a) concentrations in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1997;20:829-31.
127. Mykkanen L, Zaccaro DJ, O'Leary DH, Howard G, Robbins DC, Haffner SM. Microalbuminuria and carotid artery intima-media thickness in nondiabetic and NODDM subjects: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Stroke* 1997;28:1710-6.

128. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, et al. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1432-8.
129. Bonora E, Tessari R, Micciolo R, et al. Intimal-medial thickness of the carotid artery in nondiabetic and NIDDM patients: relationship with insulin resistance. *Diabetes Care* 1997;20:627-31.
130. Wagenknecht LE, Zaccaro D, Espeland MA, Karter AJ, O'Leary DH, Haffner SM. Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1035-41.
131. Yamasaki Y, Kodama M, Nishizawa H, et al. Carotid intima-media thickness in Japanese type 2 diabetic subjects: predictors of progression and relationship with incident coronary heart disease. *Diabetes Care* 2000;23:1310-5.
132. Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2001;357:577-81.
133. Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN; ARBITER. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness. *Circulation* 2002;106:2055-60.
134. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2003;348:2294-2303.
135. Beishuizen ED, van de Ree MA, Jukema JW, et al. Two-year statin therapy does not alter the progression of intima-media thickness in patients with type 2 diabetes without manifest cardiovascular disease. *Diabetes Care* 2004;27:2887-92.

136. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:2005-16.
137. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:685-96.
138. Kodama M, Yamasaki Y, Sakamoto K, et al. Antiplatelet drugs attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes. *Thromb Res* 2000;97:239-45.
139. Ahn CW, Lee HC, Park SW, et al. Decrease in carotid intima media thickness after 1 year of cilostazol treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;52:45-53.
140. Gronholdt ML, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, Sillesen H. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. *Circulation* 2001;104:68-73.
141. Mathiesen EB, Bonna KH, Joakimsen O. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: The Tromso Study. *Circulation* 2001;103:2171-5.
142. Ostling G, Hedblad B, Berglund G, Goncalves I. Increased echolucency of carotid plaques in patients with type 2 diabetes. *Stroke* 2007;38:2074-8.
143. Gronholdt ML. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2-13.
144. Turu M, Krupinski J, Catena E, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187:161-9.

145. Varenne O. How to detect atheromatous coronary heart disease in type 2 diabetic patients? *Arch Cardiovasc Dis* 2008;101:30-5.
146. Anand DV, Lim E, Hopkins D, et al. Risk stratification in uncomplicated type 2 diabetes: prospective evaluation of the combined use of coronary artery calcium imaging and selective myocardial perfusion scintigraphy. *Eur Heart J* 2006;27:713-21.
147. Raggi P, Shaw LJ, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of coronary artery calcium screening in subjects with and without diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1663-9.
148. Qu W, Le TT, Azen SP, et al. Value of coronary artery calcium scanning by computed tomography for predicting coronary heart disease in diabetic subjects. *Diabetes Care* 2003;26:905-10.
149. Pundziute G, Schuijf JD, Jukema JW, et al. Noninvasive assessment of plaque characteristics with multislice computed tomography coronary angiography in symptomatic diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1113-9.
150. Scholte AJ, Schuijf JD, Kharagjitsingh AV, et al. Prevalence of coronary artery disease and plaque morphology assessed by multi-slice computed tomography coronary angiography and calcium scoring in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *Heart* 2008;94:290-5.
151. Ibebuogu UN, Nasir K, Gopal A, et al. Comparison of atherosclerosis plaque burden and composition between diabetic and non diabetic patients by non invasive CT angiography. *Int J Cardiovasc Imaging* 2009;25:717-23.
152. Loffroy R, Bernard S, Sérusclat A, et al. Noninvasive assessment of the prevalence and characteristics of coronary atherosclerotic plaques by multidetector computed tomography in asymptomatic type 2 diabetic patients at high risk of significant coronary artery disease: a preliminary study. *Arch Cardiovasc Dis* 2009;102:607-15.



153. Hadamitzky M, Hein F, Meyer T, et al. Prognostic value of coronary computed tomographic angiography in diabetic patients without known coronary artery disease. *Diabetes Care* 2010;33:1358-63.
154. Bernard S, Loffroy R, Sérusclat A, et al. Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Atherosclerosis* 2009;203:429-35.
155. Schuijf JD, Bax JJ, Jukema JW, et al. Noninvasive angiography and assessment of left ventricular function using multislice computed tomography in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:2905-10.
156. Schuijf JD, Mollet NR, Cademartiri F, et al. Do risk factors influence the diagnostic accuracy of noninvasive coronary angiography with multislice computed tomography? *J Nucl Cardiol* 2006;13:635-41.
157. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 1998;21:1138-45.
158. Bernard S, Sérusclat A, Targe F, et al. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2005;28:1158-62.
159. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al., for the AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579-85.
160. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841-3.

161. Inoue F, Sato Y, Matsumoto N, Tani S, Uchiyama T. Elevation of plaque texture by means of multislice computed tomography in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J* 2004;68:840-4.
162. Cai JM, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of human carotid atherosclerotic lesions with in vivo multicontrast magnetic resonance Imaging. *Circulation* 2002;106:1368-73.
163. Yuan C, Zhang SX, Polissar NL. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 2002;105:181-5.
164. Saam T, Yuan C, Zhao XQ, et al. Assessment of rosuvastatine treatment on carotid atherosclerosis in moderately hypercholesterolemic subjects using high-resolution MRI. Abstract EAS Congress, Prague, 23-26 April 2005.
165. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults: Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
166. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM; Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANAES III participants age over 50 years and older. *Diabetes* 2003;52:1210-4.
167. Cassidy FH, Yokoo T, Aganovic L, et al. Fatty liver disease: MR imaging techniques for the detection and quantification of liver steatosis. *Radiographics* 2009;29:231-60.

168. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
169. Sanyal AJ, American Gastroenterological Association. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1705-25.
170. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594-8.
171. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:165-9.
172. Roden M. Mechanisms of disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:335-48.
173. Hickman IJ, Russell AJ, Prins JB, Macdonald GA. Should patients with type 2 diabetes and raised liver enzymes be referred for further evaluation of liver disease? *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80:e10-2.
174. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-95.
175. Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16:141-9.
176. Guiu B, Loffroy R, Petit JM, et al. Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy. *Eur Radiol* 2009;19:1786-93.
177. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.

178. Yki-Jarvinen H, Westerbacka J. The fatty liver and insulin resistance. *Curr Mol Med* 2005;5:287-95.
179. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2004;53:2855-60.
180. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, et al. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 2005;28:1757-62.
181. Hanley AJ, Williams K, Festa A, et al. Liver markers and development of the metabolic syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 2005;54:3140-7.
182. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005;22:1129-33.
183. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:421-7.
184. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
185. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systematic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:850-5.
186. Kugelmas H, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003;38:413-9.
187. Musso G, Gambino R, Durazzo M, et al. Adipokines in NASH: post-prandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005;42:1175-83.

188. Targher G, Bertolini L, Scala L, et al. Non-alcoholic hepatic steatosis and its relation to increased plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in nondiabetic men. Role of visceral adipose tissue. *Diabet Med* 2005;22:1354-8.
189. Targher G, Bertolini L, Zenari L. Hypoadiponectinemia is closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese subjects. *Diabetes Care* 2004;27:2085-6.
190. Pagano C, Soardo G, Esposito W, et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005;152:113-8.
191. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol* 2006;64:679-83.
192. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730-7.
193. Xu A, Wang Y, Keshaw H, et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
194. Musso G, Gambino R, De Michieli F, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:909-16.
195. Musso G, Cassader M, Gambino R, Durazzo M, Pagano G. Association between postprandial LDL conjugated dienes and the severity of liver fibrosis in NASH. *Hepatology* 2006;43:1169-70.
196. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:230-7.
197. Turkish AR. Nonalcoholic fatty liver disease: emerging mechanisms and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:128-33.

198. Bernard S, Touzet S, Personne I, et al. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:995-9.
199. Mc Cullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:521-33.
200. Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabet Med* 2007;24:1-6.
201. Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, et al. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:874-80.
202. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128:1898-906.
203. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, et al. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* 2008;47:1513-23.
204. Guiu B, Petit JM, Loffroy R, et al. Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 2009;250:95-102.
205. Targher G, Chonchol M, Bertolini L, et al. Increased risk of CKD among type 2 diabetics with nonalcoholic fatty liver disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1564-70.
206. Hwang ST, Cho YK, Yun JW, et al. Impact of NAFLD on microalbuminuria in patients with prediabetes and diabetes. *Intern Med J* 2010;40:437-42.
207. O'Leary DH, Polak JF. Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. *Am J Cardiol* 2002;90:18-21.

208. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men. Role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care* 2004;7:1498-500.
209. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 2006;29:55-60.
210. Volzke H, Robinson DM, Kleine V, et al. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:1848-53.
211. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steato-hepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005;330:326-35.
212. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke* 1992;23:1752-60.
213. Petit JM, Guiu B, Terriat B, et al. Nonalcoholic fatty liver is not associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4103-6.
214. Petit JM, Guiu B, Masson D, et al. Specifically-PNPLA3-mediated accumulation of liver fat in obese patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;In Press.
215. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-32.
216. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:473-8.
217. Schindhelm RK, Diamant M, Bakker SJ, et al. Liver alanine aminotransferase, insulin resistance and endothelial dysfunction in normotriglyceridaemic subjects with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2005;35:369-74.

218. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Increased prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2006;23:403-9.
219. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1212-8.
220. Lin YC, Lo HM, Chen JD. Sonographic fatty liver, overweight and ischaemic heart disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:4838-42.
221. Kessler A, Levy Y, Roth A, et al. Increased prevalence of NAFLD in patients with acute myocardial infarction independent of BMI. *Hepatology* 2005;42:623A.
222. Schwimmer JB, Deutsch R, Behling C, Lavine JE. Fatty liver as a determinant of atherosclerosis. *Hepatology* 2005;42:610A.
223. Assy N, Djibre A, Farah R, Grosovski M, Marmor A. Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* 2010;254:393-400.
224. Loffroy R, Guiu B, Terriat B, et al. Liver fat content is negatively associated with atherosclerotic carotid plaque in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2010;Under review.
225. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-21
226. Wannamethee G, Ebrahim S, ShaperAG. Gamma-glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischaemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol* 1995;142:699-708.
227. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation* 2005;112:2130-7.



228. Ioannou GN, Weiss NS, Boyko EJ, Mozaffarian D, Lee SP. Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology* 2006;43:1145-51.
229. Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007;191:319-96.
230. Targher G, Bertolini L, Poli F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005;54:3541-6.
231. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1567-73.
232. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004;39:1647-54.
233. Uygun A, Kadayifci A, Isik A, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-44.
234. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo G, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004;39:188-96.
235. Rallidis LS, Drakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis* 2004;174:193-6.
236. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
237. Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol* 2001;35:531-7.
238. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-50.

239. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;118:1117-23.
240. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:475-83.
241. Choudhury J, Sanyal AJ. Clinical aspects of fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2004;24:349-62.
242. Toledo FG, Sniderman AD, Kelley DE. Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1845-50.
243. Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, et al. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:200-6.
244. Petit JM, Minello A, Jooste V, et al. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to steatosis in hepatitis C virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2240-3.
245. Bernard S, Touzet S, Personne I, et al. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:995-9.
246. Utzschneider KM, Kahn SE. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4753-61.
247. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999-1001.

248. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004;40:781-6.
249. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784-92.
250. Stefan N, Machicao F, Staiger H, et al. Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia* 2005;48:2282-91.
251. Weng W, Brandenburg NA, Zhong S, et al. ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase. Studies In apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. *J Lipid Res* 1999;40:1064-70.
252. Lara-Castro C, Hunter GR, Lovejoy JC, Gower BA, Fernandez JR. Apolipoprotein A-II polymorphism and visceral adiposity in African-American and white women. *Obes Res* 2005;13:507-12.
253. Weiner MW, Adam WR. Magnetic resonance spectroscopy for evaluation of renal function. *Semin Urol* 1985;3:34-42.
254. McIntosh TK, Faden AI, Bendall MR, Vink R. Traumatic brain injury in the rat: alterations in brain lactate and pH as characterized by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem* 1987;49:1530-40.
255. Keller AM, Sorce DJ, Sciacca RR, Barr ML, Cannon PJ. Very rapid lactate measurement in ischemic perfused hearts using <sup>1</sup>H MRS continuous negative echo acquisition during steady-state frequency selective excitation. *Magn Reson Med* 1988;7:65-78.

256. Barany M, Langer BG, Glick RP, Venkatasubramanian PN, Wilbur AC, Spigos DG. In vivo H-1 spectroscopy in humans at 1.5 T. *Radiology* 1988;167:839-44.
257. Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 1994;12:487-95.
258. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-7.
259. Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Tani S, Goto M. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Jpn J Med* 1988;27:142-9.
260. Longo R, Pollesello P, Ricci C, et al. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995;5:281-5.
261. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999;276:E977-989.
262. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462-468.
263. Thomas EL, Hamilton G, Patel N, et al. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 2005;54:122-7.

**ANNEXE A**

**Publication n°1**

**Boussel L, Cakmak S, Wintermark M, Nighoghossian N, Loffroy R,**

**Coulon P, Derex L, Cho HT, Douek P.**

**MDCT of Heart, Extra- and Intracranial Arteries in Etiological Workup  
of Ischemic Stroke.**

***Radiology 2010; Accepted.***

## **Manuscript Title**

MDCT of heart, extra- and intracranial arteries in etiological workup of ischemic stroke

## **Authors and Affiliations**

Loic. Bussel, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Serkan Cakmak, MD<sup>2,3</sup>, Max Wintermark, MD, PhD<sup>4</sup>, Norbert Nighoghossian, MD, PhD<sup>2,3</sup>, Romaric Loffroy, MD<sup>2</sup>, Philippe Coulon, PhD<sup>5</sup>, Laurent Derex, MD, PhD<sup>3</sup>, Tae Hee Cho, MD<sup>3</sup>, Philippe Douek, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Radiology, Louis Pradel Hospital, 28 Av. Doyen Lepine, 69500 Bron, France.

<sup>2</sup> CREATIS, UMR CNRS 5515, INSERM U630, Lyon, France

<sup>3</sup> Stroke Unit, Pierre Wertheimer Hospital, 59 Bd Pinel, 69500 Bron, France

<sup>4</sup> Department of Radiology, University of Virginia School of Medicine, PO Box 800793,  
Charlottesville, VA 22908

<sup>5</sup> Philips Healthcare, 33 rue de Verdun, 92516 Suresnes Cedex, France

## **Corresponding Author**

Loic Bussel, Department of Radiology, Louis Pradel Hospital, 28 avenue Doyen Lépine, 69500  
Bron, France

Tel: + 33 (0)4 72 35 73 53

Fax: + 33 (0)4 72 35 72 91

Email: loic.bussel@gmail.com

**Type of Manuscript**

Original Research

**Word Count for the Text**

3383 words

## **MDCT of heart, extra- and intracranial arteries in etiological workup of ischemic stroke**

### **Type of Manuscript**

Original Research

### **Advances in Knowledge**

- One-time MDCT (Multidetector CT) is feasible as a first line examination in etiological workup of acute ischemic stroke
- MDCT allowed correct classification of stroke etiology in greater than 80% of patients

### **Implications for Patient Care**

- MDCT allows rapid workup of ischemic stroke



## **ABSTRACT**

**Purpose:** To assess the potential of a single session, MDCT protocol in the etiological workup of acute ischemic stroke as compared to established methods.

**Methods:** Patients presenting with a recent ischemic stroke were recruited in this prospective study after IRB approval. Each patient was scheduled for two strategies, including 1) a standard approach including transthoracic and transesophageal echocardiography (TTE and TEE), Duplex Ultrasound of neck vessels (DUS) and Magnetic Resonance Angiography of neck and brain vessels (MRA) and 2) a single session, MDCT protocol covering heart, neck and brain vessels. We sought to detect major etiology of stroke, including cardiac sources of embolism, atheroma of the aortic arch, and extra- and intracranial vessels, using both strategies.

**Results:** MDCT, MRI, and DUS was performed in 46 patients; 39 of these patients also underwent TEE. Sensitivity and specificity of MDCT for cardiac sources and for major arterial atheroma was 72 and 95.2 % and 100 and 90.9 %, respectively. Final classification using the standard approach was "Cardiac sources" in 20 cases (43.5%), "Major arteries atheroma" in 9 cases (19.5%), "Multiple sources" in 4 cases (8.7%) and "Cryptogenic" in 13 cases (28.3%). MDCT correctly classified 82.6 % of the patients.

**Conclusion:** MDCT is a promising tool in etiological assessment of ischemic stroke, although identification of minor cardiac sources by MDCT requires the establishment of robust criteria.

## **INTRODUCTION**

Early determination of ischemic stroke etiology is essential for secondary prevention, since the risk of recurrence is highly dependent of the underlying etiology (1). Major identified causes of ischemic stroke are extra- or intracranial atheroma, cardio-embolic sources, micro-vascular disease and aortic arch atheroma (2, 3). This etiological workup is usually based on a imaging package including: duplex ultrasound (DUS), MR angiography (MRA) or CT angiography of the neck and brain vessels, transthoracic- (TTE) and transesophageal echocardiography (TEE). This approach is time consuming and expensive. In addition, secondary stroke prevention strategies may be delayed.

Multi-Detector CT scanner (MDCT) has been demonstrated to be an accurate and powerful tool to detect atheroma in extra- and intracranial vessels (4, 5). More recently, electrocardiographically (ECG)-gated contrast-enhanced MDCT has been proposed to study left ventricle wall motion, ejection fraction (6, 7), intra-cardiac thrombus (8) and patent foramen ovale (9, 10). A single session MDCT study combining heart, aortic arch, extra- and intracranial arteries may allow detection of main sources of ischemic stroke.

In this study, we assess the potential of a single session, MDCT protocol in the etiological workup of acute ischemic stroke as compared to established imaging methods.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Study design:** We performed a single center, prospective, open pilot study. A time period of 9 months was prospectively decided to perform the evaluation of the MDCT protocol. The study started on August 1, 2007 and ended on April 30, 2008. Patients were recruited at the Lyon Stroke Unit. Inclusion criteria were age between 18 and 90 years and acute ischemic stroke (< one week) diagnosed by a stroke neurologist. Exclusion criteria were any contraindication for MRI, TEE or iodine contrast injection and inability to obtain an informed consent. NIHSS (National Institute of Health Stroke Score) score (11) at admittance was recorded for each patient. Local ethical committee approval and informed consent were obtained for each patient. The etiological workup of each acute ischemic stroke included a one-time MDCT examination of the heart, the aorta and the extra- and intracranial vessels and a standard protocol combining MRA of the extra- and intracranial vessels, DUS of the extra-cranial vessels, TTE and TEE of the heart and the aorta for all patients.

**Imaging protocols:** Contrast-enhanced MDCT was performed on a Philips Brilliance® 40 scanner with IOMERON 400 (Bracco®) as contrast agent injected at the right cubital vein with a 18 G catheter. Patient was installed in supine head-first position. A two-step protocol was performed. First, the ECG-gated aortic and heart acquisition was performed in the head-to-feet direction covering the aortic and heart area from the top of the aortic arch to the diaphragm. The following parameters were used: number of detectors 40, individual detector width 0.625 mm, retrospective ECG gating, tube voltage/current 120 kV/300 mAs, pitch 0.2 and half rotation reconstruction. 70 ml of contrast agent were injected at 4 ml/s followed by 60 ml of saline solution at the same rate. A bolus tracking method on the ascending aorta was used with a

threshold of 200 UH. Reconstruction parameters for axial slices were 1.5 mm effective section thickness, 1 mm increment, reconstruction filter CB and adapted field of view. Retrospective ECG-gated reconstruction was performed at 40% and 75% of the R-R interval.

Then a non ECG-gated acquisition was performed two minutes after, from the aortic arch to the intracranial arteries (approx. 50 cm) with the following parameters: feet-to-head direction, slice thickness = 1.2 mm, Pitch=1.2, voltage = 120 kV, amperage = 300 mAs/slice, reconstruction filter B, bolus tracker set on the aortic arch with a threshold at 200 HU. 50 ml contrast agent were injected at 4 ml/s followed by 60 ml of saline solution at the same rate, leading to a total injected contrast volume of 120 ml. Patient were imaged with the arms overhead during the aortic and heart acquisition and arms at the side during the second acquisition. General guidelines for ECG-gated cardiac MDCT were respected in term of qualifications of personnel, radiation dose monitoring, contrast agent and beta-blockers administration safety rules (12-14). Beta-blockers were administered if necessary when the cardiac frequency was higher than 80 bpm (Esmolol, BREVIBLOC, BAXTER, USA, 0,5 to 1 mg/kg IV). CT was performed even in case of atrial fibrillation. Total dose radiation and cardiac frequency during the examination were recorded for each patient.

DUS examinations were performed on a Acuson Antares® according to the Society of Radiologists in Ultrasound quality criteria, including gray-scale, color Doppler, and spectral DUS at a scan angle of sixty degrees (15). All studies included measurements of peak systolic velocity, end-diastolic velocity, ratio of the internal to common carotid artery velocities and planimetric estimation of the stenosis according to NASCET criteria (16).

MRI and CE-MRA were performed at 1.5 Tesla on a Philips INTERA® or a Siemens AVANTO® scanner. Head exploration included brain imaging to confirm and localize the stroke

(FLAIR, Diffusion Weighted Imaging and T2\* weighted sequences) and intracranial vessel angiography with Time of Flight sequence. MRA of the extra-cranial vessels was performed according to a standard gadolinium enhanced method previously published (4) based on a 3-dimensional gradient echo acquisition with the following parameters: repetition time: 3.7 ms; echo time: 1.3 ms; acquisition time: 56 s; voxel size: 0.5x0.5x0.6 mm; intravenous administration of 0.2 ml/kg of Gd-DOTA (DOTAREM, Guerbet, France) with a nonmagnetic power injector and automatic bolus detection method.

Echocardiography was carried out on a Hewlett-Packard Sonos 5500® or Acuson C512® scanner, including 2.5 and 3.5 MHz transthoracic and 5 MHz transesophageal probes. For TTE 4, 2, 3 chambers and short axis basal, median and apical views were obtained. For TEE, cardiac structures were first examined at least in 0, 45 and 120 degrees at two levels, mid-oesophageal and transgastric. Then the transducer was gradually withdrawn to obtain serial short-axis views of the descending aorta and the aortic arch. Aortic arch atheroma was evaluated according to previously published criteria (17, 18).

**Image evaluation:** Results of DUS, TEE, TTE and MRI were considered the “standard of reference”. They were consensually reviewed according to the criteria described above by two independent trained senior radiologists (RL, PD). All MDCT examinations were consensually analyzed by three independent senior cardio-vascular radiologists (LB, PD and RL) with at least a five years experience. All reviewers were blinded to stroke location, clinical findings and results of the other studies.

The diagnostic workup was focused on the following abnormalities: For vascular imaging, presence of an atherosclerotic lesion of the carotid arteries leading to a stenosis of more than 50% according to NASCET criteria (16); atherosclerotic lesion of the vertebral arteries leading to a

stenosis of more than 70% (19); aortic atheroma of more than 4 mm (18); presence of intracranial artery stenosis of more than 50%. For cardiac imaging, both the 40% and the 75% cardiac phases were analyzed. Major sources of cardioembolic stroke, i.e. intracardiac thrombus and akinetic or hyokinetic segmental myocardial wall, were reported. Regarding minor cardiac sources, interatrial septal aneurysm (IASA) and patent foramen ovale were analyzed by using the following criteria. For PFO detection: presence of a distinct “flap” in the left atrium at the expected location of the septum primum; presence of a continuous “column” of contrast material between the septum primum and septum secundum connecting the left and right atria or presence of a “jet” of contrast material from the column into the right atrium (9). For IASA: a bulge of the septum secundum of more than 10 mm in one of the two atria (10). Spontaneous echo contrast (defined as a pattern of slowly swirling intra-atrial echo densities (20, 21)), an additional risk factor for cardioembolic source, was reported when present on TEE or TTE.

Finally, in order to approach the TOAST classification (2), all patients were classified according to the results of the individual examinations (termed as "Final Classification") as: "Cardiac sources" or "Major arteries atheroma " when a unique cardioembolic or major arteries atheroma cause was identified; "Multiple sources" when several potential causes were identified in the same patient; "Cryptogenic" when no cause was found. Major arteries atheroma was used only for patient presenting with either a significant atheroma of the aortic arch or an extra- or intracranial vascular lesion corresponding to the present stroke territory.

**Statistical Analysis:** Sensitivity and specificity and their 95% confidence interval (95 % CI) of MDCT were calculated for each group ("Major arteries atheroma" and "Cardiac sources").

Concordance between the two methods was assessed using a kappa statistic for "Cardiac sources" or "Major arteries atheroma" and "Final classification". Agreement between the two techniques

was rated good for kappa between 0.61 and 0.8 and very good for kappa between 0.81 and 1.

The Mann-Whitney U test was used to compare the age of male and female patients.  $P \leq .05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

All statistical analysis was performed using Intercooled Stata 10.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

## RESULTS

Between August 2007 and April 2008, 187 patients admitted in our stroke unit were eligible for the study. Forty seven of them provided an informed consent. One patient was excluded from the study because of very poor MDCT scanner image quality. This patient was agitated and unable to collaborate, more specifically to perform an apnea for the MDCT acquisition. Thus data interpretation involved 46 patients. Table 1 summarizes demographic data and risk factors for these patients. Mean patient's age was 63 +/- 11.4 years (range 36-84 years). There was no significant difference in age between male (63.6 +/- 11.1 years; range 38- 84) and female (60 +/- 13.1 years; range 36- 76 years),  $p=0.5$ . Mean NIHSS score at admission was 8.4 +/- 3.8 (range 3-17). All patients had a sufficient level of conscience and understanding to provide an informed consent and to follow the apnea commands during the CT examination. Ischemic infarcts were detected by brain MRI in the internal carotid territory in 40 patients (87 % of the cases) and the vertebro-basilar territory in 6 patients (13 % of the cases). One patient presented with a pure lacunar stroke of the basis pontis proven by MRI.

Mean radiation dose was 20.8 +/- 3.2 mSv (range 15.6 – 33.1 mSv).

During the MDCT examination, mean heart rate was 67 +/- 15 bpm (range 57 – 95 bpm). Beta-blockers were administered in 17 patients. Three patients presented with an atrial fibrillation. All patients had MRI, DUS and TTE. Thirty-nine underwent a TEE examination as TEE was impossible in seven patients because of swallowing abnormalities.

MRI was performed in mean 2.8 +/- 3.1 days prior to MDCT (range -7 - +6 days), DUS and TTE was performed on the same day, 0.8 +/- 2.4 days prior to MDCT (range -6 - +4 days) and TEE 2.5 +/- 2.8 days after MDCT (range -5 - +10 days).

Results of cardiac explorations are provided in Table 2. Regarding major sources of



cardioembolic stroke, one case of intra-cardiac thrombus, localized at the apex of the left ventricle, was observed with MDCT but missed by TEE performed at the same day (Figure 1). MDCT failed to detect one case of left ventricle wall hypokinesia out of 9 diagnosed with TEE. Regarding minor sources, 10 cases of septal abnormalities (PFO and/or IASA) out of 13 were diagnosed with MDCT (Figures 2 and 3). Finally, spontaneous echo contrast was detected in three cases with TEE. These results lead to a sensitivity and specificity of the MDCT for cardiac sources of 72 % (95 % CI: 50.6 - 87.9 %) and 95.2 % (95 % CI: 76.1 - 99.8 %) and a kappa of 0.79 corresponding to a good agreement between the two techniques.

Regarding the aortic arch examination, four patients were detected with an atheroma more than 4 mm thick using TEE. MDCT confirmed four cases and found two additional cases missed by TEE (example Figure 4).

Analysis of the extra- and intracranial arteries showed 14 carotid artery stenoses of greater than 50%, including 10 cases of complete obstruction, and four extra-cranial vertebral artery lesions detected with MDCT. These lesions were confirmed by DUS and/or MRA in all cases.

Regarding the stroke of the internal carotid territory, a homolateral carotid artery stenosis of more than 50% was the only detected source in 6 patients. One case of stroke of the vertebro-basilar territory was related to atheroma. Finally, MRA detected two cases of asymptomatic (i.e. contralateral to the actual stroke) intracranial artery stenosis (middle cerebral artery), confirmed by MDCT. These results lead to a sensitivity and specificity of the MDCT for major arteries atheroma of 100 % (95 % CI: 85.7 - 100 %) and 90.9 % (95 % CI: 70.8 - 98.9 %) and a kappa of 0.92 corresponding to a very good agreement between the two techniques.

Final classification using the combined strategy was "Cardiac sources" in 20 cases (43.5%), "Major arteries atheroma" in 9 cases (19.5%), "Multiple sources" in 4 cases (8.7%) and "Cryptogenic" in 13 cases (28.3%). Using MDCT, the final classification was "Cardiac sources" in 15 cases (32.6%), "Major arteries atheroma" in 12 cases (26.1%), "Multiple sources" in 3 cases (6.5%) and "Cryptogenic" in 16 cases (34.8%). This leads to a correct classification with MDCT in 82.6 % of the patients and a kappa of 0.78 corresponding to a good agreement between the two techniques.

## **DISCUSSION**

This study demonstrates the feasibility and the potential of a single session MDCT in the etiological workup of acute ischemic stroke. MDCT appears feasible and well tolerated in comparison to reference methods such as TEE. Patient tolerance of MDCT is mainly due to the short duration of the examination, which is critical in acute stroke patients, who can potentially be unstable and agitated.

MDCT has previously been reported to have good accuracy for identification of extra- and intracranial atheromatous disease (4, 22). MDCT may also provide information regarding plaque composition, including calcification and plaque attenuation characteristics, both which may be of interest in assessing "vulnerable" plaques (23). Furthermore, MDCT has been demonstrated to be efficacious and reproducible in detecting and quantifying aortic arch atheroma (24, 25). In terms of cardio-embolic etiologies, Hur et al. showed a sensitivity of 89 % and specificity of 100% (10). In comparison, our study showed a lower sensitivity, which might have been related to differences in MDCT protocol. Indeed, Hur et al. used a prospective ECG-triggered acquisition, which strongly decreases the radiation dose and thus allows performance of a second, delayed acquisition. This allows to detect circulatory stasis (corresponding to spontaneous echo contrast in ultrasound) which was systematically missed with our CT protocol.

Regarding PFO and IASA, our study showed similar results to those of Hur et al., but lower sensitivity than Williamson et al. (9). This lack of sensitivity of MDCT for PFO and ASIA detection will certainly be difficult to overcome as the dynamic provocative maneuver performed in TEE to demonstrate the right-to-left shunt would need an high temporal resolution and

multiple dynamic scan at the same spatial to be reproduced with MDCT, leading to an increase in radiation dose. Finally, CT accuracy in the detection of left ventricular aneurysms, kinetic abnormalities and intra-cardiac thrombus has been established in several studies (8, 10, 26-29). In our report, one intracardiac thrombus was missed by TEE but identified by CT. This thrombus was located at the apex of the left ventricle, a zone known to be particularly difficult to study with TEE (30).

In our study, minor sources of cardio-embolic etiologies had the greatest impact on patients' final misclassification by MDCT. Furthermore, lacunar strokes (one patient in our study) are considered as "cryptogenic stroke" with both strategies as no brain examination was included in our etiological workup. Thus, in case of negative MDCT, it may be necessary to perform complementary cardiac and brain examinations, ideally with TEE and MRI, as these techniques have the highest sensitivity (31, 32).

The CT protocol we propose has two main limitations. First, two intra-venous contrast injections are required to study the chest and neck areas. Moving to a single injection protocol would be much preferable in order to decrease the total amount of iodine. This would necessitate a change in the acquisition mode during the scanning as ECG gating is required for the chest examination but must be switched off on the neck in order to decrease the radiation dose. This feature is not actually available on actual clinical CT scanners but represent an important challenge for future CT developments.

Radiation dose is the second main limitation in our protocol. Despite an attempt of lowering the dose by decreasing the mAs (300 mAs/slice), the retrospective helical mode we used for cardiac examination led to a high radiation exposure. An optimal CT protocol for diagnosis and

etiological workup might include a CT brain perfusion study followed by a single shot acquisition with ECG gated prospective mode on the chest (in feet-to-head direction) followed by a non ECG-gated acquisition on the neck vessels. Furtado et al. recently proposed such a combination with a 64 detectors scanner and a protocol allowing an evaluation of coronary arteries (35). They reported good overall image quality but a high rate of failed studies. Newly available, large detector CT scanners may address these shortcomings. Nevertheless this strategy would need further validation mainly regarding the accuracy of CT brain perfusion in identifying lacunar stroke in comparison with brain MRI.

Another limitation in our study related to the difficulties in establishing a standard of reference. Indeed, if the equivalence in term of diagnosis accuracy between MDCT and MRI for carotid arteries study is well established (4, 22), the ability of MDCT for aorta and cardiac analysis is still debated. In our study we considered as false positive any finding from MDCT not confirmed by either TTE or TEE. This leads to misclassify two large aortic plaques and one thrombus of the left ventricle obvious with MDCT, decreasing the overall specificity of the technique. A comparison with another method to investigate cardiac sources such as cardiac MRI or a test of the combination of MSCT and TEE or TTE would be of interest.

An additional limitation of our study was the absence of calculation of intra- and inter-observer reproducibility. Indeed, the design of this open pilot study included a consensual analysis of all images by experienced observers. As such, accuracy values are probably overstated. Finally, the delay between CT and the other examinations was variable which might hampered the comparison between CT and other techniques. However performing all examinations within one day is generally not possible due to patients' clinical condition.

In conclusion, MDCT is a promising tool in the etiological screening of ischemic stroke. MDCT may be the first line imaging modality identifying acute ischemic stroke etiologies, as it allowed a correct etiologic classification in up to 82% of the patients. Negative MDCT exams should be confirmed with TEE and MRI. This imaging strategy should be validated a larger randomized study involving medico-economic analysis to prove its cost effectiveness in the ischemic stroke workup.

## **ACKNOWLEDGMENT**

We acknowledge Mohamed Aissat, Maxime Tardieu, Delphine Gamondes and Ingrid Sanchez form the department of Radiology - Louis Pradel Hospital, Lyon, France. We acknowledge Mark Inglin for his help in manuscript editing.

We also acknowledge Murielle Rabilloud form the department of Biostatistic - Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, for her help in statistical analysis.

No conflict of Interest.

## REFERENCES

1. Lovett JK, Coull AJ, Rothwell PM. Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies. *Neurology* 2004; 62:569-573.
2. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24:35-41.
3. Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol* 2005; 58:688-697.
4. Nonent M, Serfaty JM, Nighoghossian N, et al. Concordance rate differences of 3 noninvasive imaging techniques to measure carotid stenosis in clinical routine practice: results of the CARMEDAS multicenter study. *Stroke* 2004; 35:682-686.
5. Nguyen-Huynh MN, Wintermark M, English J, et al. How accurate is CT angiography in evaluating intracranial atherosclerotic disease? *Stroke* 2008; 39:1184-1188.
6. van der Vleuten PA, Willems TP, Gotte MJ, et al. Quantification of global left ventricular function: comparison of multidetector computed tomography and magnetic resonance imaging. a meta-analysis and review of the current literature. *Acta Radiol* 2006; 47:1049-1057.
7. Woodard PK, Bhalla S, Javidan-Nejad C, Gutierrez FR. Non-coronary cardiac CT imaging. *Semin Ultrasound CT MR* 2006; 27:56-75.
8. Hur J, Kim YJ, Nam JE, et al. Thrombus in the left atrial appendage in stroke patients: detection with cardiac ct angiography--a preliminary report. *Radiology* 2008; 249:81-87.
9. Williamson EE, Kirsch J, Araoz PA, et al. ECG-gated cardiac CT angiography using 64-MDCT for detection of patent foramen ovale. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190:929-933.



10. Hur J, Kim YJ, Lee HJ, et al. Cardiac computed tomographic angiography for detection of cardiac sources of embolism in stroke patients. *Stroke* 2009; 40:2073-2078.
11. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20:864-870.
12. Budoff MJ, Cohen MC, Garcia MJ, et al. ACCF/AHA clinical competence statement on cardiac imaging with computed tomography and magnetic resonance. *Circulation* 2005; 112:598-617.
13. Schroeder S, Achenbach S, Bengel F, et al. Cardiac computed tomography: indications, applications, limitations, and training requirements: report of a Writing Group deployed by the Working Group Nuclear Cardiology and Cardiac CT of the European Society of Cardiology and the European Council of Nuclear Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29:531-556.
14. Weinreb JC, Larson PA, Woodard PK, et al. American College of Radiology clinical statement on noninvasive cardiac imaging. *Radiology* 2005; 235:723-727.
15. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, et al. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology* 2003; 229:340-346.
16. Clinical alert: benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of the internal carotid artery. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Stroke and Trauma Division. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) investigators. *Stroke* 1991; 22:816-817.
17. Weber A, Jones EF, Zavala JA, Ponnuthurai FA, Donnan GA. Intraobserver and interobserver variability of transesophageal echocardiography in aortic arch atheroma measurement. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:129-133.
18. Cohen A, Tzourio C, Bertrand B, Chauvel C, Bousser MG, Amarenco P. Aortic plaque

morphology and vascular events: a follow-up study in patients with ischemic stroke. FAPS Investigators. French Study of Aortic Plaques in Stroke. *Circulation* 1997; 96:3838-3841.

19. Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, et al. Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* 2005; 352:1305-1316.

20. Harloff A, Handke M, Reinhard M, Geibel A, Hetzel A. Therapeutic strategies after examination by transesophageal echocardiography in 503 patients with ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37:859-864.

21. Zabalgoitia M, Halperin JL, Pearce LA, Blackshear JL, Asinger RW, Hart RG. Transesophageal echocardiographic correlates of clinical risk of thromboembolism in nonvalvular atrial fibrillation. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1622-1626.

22. Bash S, Villablanca JP, Jahan R, et al. Intracranial vascular stenosis and occlusive disease: evaluation with CT angiography, MR angiography, and digital subtraction angiography. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; 26:1012-1021.

23. Serfaty JM, Nonent M, Nighoghossian N, et al. Plaque density on CT, a potential marker of ischemic stroke. *Neurology* 2006; 66:118-120.

24. Hussain SI, Gilkeson RC, Suarez JJ, et al. Comparing multislice electrocardiogram-gated spiral computerized tomography and transesophageal echocardiography in evaluating aortic atheroma in patients with acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008; 17:134-140.

25. Pandya DJ, Gilkeson RC, Suarez JJ, et al. Interobserver and intraobserver reliabilities of multislice electrocardiogram-gated spiral computerized tomography in evaluating aortic atheroma in patients with acute ischemic stroke. *Clin Imaging* 2008; 32:109-113.

26. Brodoefel H, Reimann A, Klumpp B, et al. Sixty-four-slice CT in the assessment of global and regional left ventricular function: comparison with MRI in a porcine model of acute and

subacute myocardial infarction. *Eur Radiol* 2007; 17:2948-2956.

27. Cury RC, Nieman K, Shapiro MD, et al. Comprehensive assessment of myocardial perfusion defects, regional wall motion, and left ventricular function by using 64-section multidetector CT. *Radiology* 2008; 248:466-475.

28. Foster CJ, Sekiya T, Love HG, Brownlee WC, Griffin JF, Isherwood I. Identification of intracardiac thrombus: comparison of computed tomography and cross-sectional echocardiography. *Br J Radiol* 1987; 60:327-331.

29. Mochizuki T, Koyama Y, Tanaka H, Ikezoe J, Shen Y, Azemoto S. Images in cardiovascular medicine. Left ventricular thrombus detected by two- and three-dimensional computed tomographic ventriculography: a new application of helical CT. *Circulation* 1998; 98:933-934.

30. Srichai MB, Junor C, Rodriguez LL, et al. Clinical, imaging, and pathological characteristics of left ventricular thrombus: a comparison of contrast-enhanced magnetic resonance imaging, transthoracic echocardiography, and transesophageal echocardiography with surgical or pathological validation. *Am Heart J* 2006; 152:75-84.

31. Galougahi KK, Stewart T, Choong CY, Yates M, Tofler GH. The Utility of Transoesophageal Echocardiography to Determine Management in Suspected Embolic Stroke. *Intern Med J* 2009.

32. Singer MB, Chong J, Lu D, Schonewille WJ, Tuhim S, Atlas SW. Diffusion-weighted MRI in acute subcortical infarction. *Stroke* 1998; 29:133-136.

33. Hsieh J, Londt J, Vass M, Li J, Tang X, Okerlund D. Step-and-shoot data acquisition and reconstruction for cardiac x-ray computed tomography. *Med Phys* 2006; 33:4236-4248.

34. Husmann L, Valenta I, Gaemperli O, et al. Feasibility of low-dose coronary CT angiography: first experience with prospective ECG-gating. *Eur Heart J* 2008; 29:191-197.

35. Furtado AD, Adraktas DD, Brasic N, et al. The Triple Rule-Out for Acute Ischemic Stroke: Imaging the Brain, Carotid Arteries, Aorta, and Heart. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010 Jun 10.

## TABLES

**Table 1:** Summary of the demographics and vascular risk factors (46 subjects)

Demographics and risk factors	Mean±S.D. or %
Age (years)	63 ± 11.4
Male sex (%)	83%
Hypertension (%)	47%
Diabetes (%)	15%
Hyperlipemia (%)	26%
Smoking (Active or quit) (%)	32%

**Table 2:** Cardiac sources of emboli detected by TTE or TEE and MDCT. For each category (Intracardiac thrombus, Left ventricle hypokinetic wall, PFO and/or ASIA and Spontaneous echo contrast), symbol "+" correspond to a detection and symbol "-" to an absence of detection of the feature by the considered method.

	Intracardiac thrombus		Left ventricle hypokinetic wall		PFO and/or ASIA		Spontaneous echo contrast	
	MDCT +	MDCT -	MDCT +	MDCT -	MDCT +	MDCT -	MDCT +	MDCT -
TTE/TEE +	0	0	8	1	10	3	0	3
TTE/TEE -	1	45	0	37	0	33	0	43

## FIGURES

**Figure 1:** MDCT, Two chambers long axis reconstruction. 77-year-old man. The thrombus of the apex of the left ventricle (arrow) appears as a non-enhanced lesion within the left ventricular cavity.

**Figure 2:** MDCT, Four chambers long axis reconstruction. 63-year-old man. Bulging of the septum secundum in the right atrium considered as an interatrial septal aneurysm.

**Figure 3:** MDCT, Four chambers long axis reconstruction. 59-year-old woman. PFO with a distinct “flap” in the left atrium at the expected location of the septum secundum (long arrow) and a “jet” of contrast material from the left into the right atrium (small arrow).

**Figure 4:** MDCT, sagittal reconstruction of the aortic arch. 84-year-old man. 5 mm thick atheroma of the aortic arch (arrows) with mixed calcified and hypodense components.



Figure 1:

MDCT, Two chambers long axis reconstruction. 77-year-old man.

The thrombus of the apex of the left ventricle (arrow) appears as a non-enhanced lesion within the left ventricular cavity.

83x74mm (300 x 300 DPI)

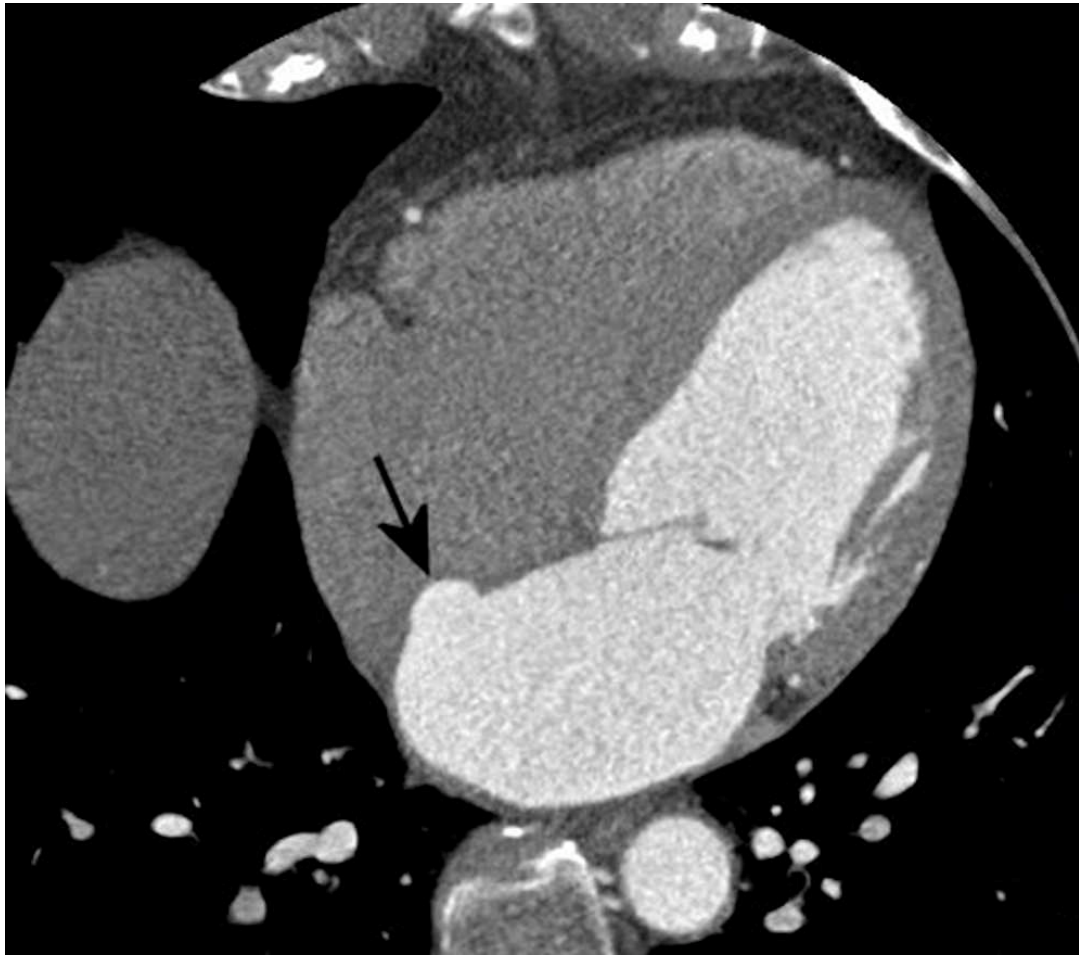


Figure 2:

MDCT, Four chambers long axis reconstruction. 63-year-old man.

Bulging of the septum secundum in the right atrium considered as an interatrial septal aneurysm.

83x74mm (300 x 300 DPI)



Figure 3:

MDCT, Four chambers long axis reconstruction. 59-year-old woman.

PFO with a distinct "flap" in the left atrium at the expected location of the septum secundum (long arrow) and a "jet" of contrast material from the left into the right atrium (small arrow).

83x86mm (300 x 300 DPI)





Figure 4:

MDCT, sagittal reconstruction of the aortic arch. 84-year-old man.

5 mm thick atheroma of the aortic arch (arrows) with mixed calcified and hypodense components.

83x71mm (300 x 300 DPI)

## **ANNEXE B**

### **Publication n°2**

**Boussel L, Herigault G, Sigovan M, Loffroy R, Canet-Soulas E, Douek PC.**

**Modified Electrocardiograph-Triggered Black-Blood Turbo Spin-Echo**

**Technique to Improve T1-Weighting in Contrast-Enhanced MRI of**

**Atherosclerotic Carotid Arteries.**

***J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 533-7.**

# Modified Electrocardiograph-Triggered Black-Blood Turbo Spin-Echo Technique to Improve T1-Weighting in Contrast-Enhanced MRI of Atherosclerotic Carotid Arteries

Loic Bousset, MD,<sup>1,3\*</sup> Gwenael Herigault, PhD,<sup>2</sup> Monica Sigovan, MSc,<sup>3</sup> Romaric Loffroy, MD,<sup>1</sup> Emmanuelle Canet-Soulas, DVM, PhD,<sup>3</sup> and Philippe Charles Douek, MD, PhD<sup>1,3</sup>

**Purpose:** To assess the efficacy of a modified electrocardiograph (EKG)-triggered black-blood T1W (T1W) spin-echo sequence in improving contrast on post-gadolinium high-resolution carotid plaque imaging by implementing heart-rate-independent contrast preparation.

**Materials and Methods:** We used a standard EKG-triggered double inversion-recovery (DIR) turbo spin-echo (TSE) sequence modified with the addition of an extra saturation (90°) radio frequency (RF) pulse placed immediately after the DIR module, shortening the repetition time to a fixed value of 400 msec. A total of 10 patients with atherosclerotic disease were included in the study. Postinjection intraplaque contrast measurements were performed on each patient for the standard and the modified sequence.

**Results:** Post-gadolinium-injection intraplaque contrast was  $31.7 \pm 12.8\%$  with the standard T1W sequence (mT1-TSE), and  $45.3 \pm 17.2\%$  with the modified T1W sequence (mT1-TSE), showing a significant contrast enhancement of 13.6% ( $P < 0.001$ ) without significant image quality modification.

**Conclusion:** The addition of a RF pulse to the standard EKG-triggered T1W TSE sequence increased intraplaque contrast without increasing sequence acquisition time. Furthermore, it appeared to be a robust technique, easy to implement on clinical scanners.

**Key Words:** high resolution MRI; carotid atherosclerotic plaque; gadolinium; MR sequence; EKG-triggering

**J. Magn. Reson. Imaging 2008;28:533–537.**

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

HIGH-RESOLUTION MRI is of great interest in vessel-wall assessment. T2-weighted (T2W) images are used to

maximize the contrast between fibrous cap and lipid core (1), but delineation of the plaque component remains difficult. Recently, many studies have focused on plaque component characterization following intravenous gadolinium contrast injection. Gadolinium uptake enhances the delineation of the arterial wall (2) and the identification of plaque elements (3–5). It also seems to be a marker of plaque inflammation (6). In this context, strong T1-weighted (T1W) sequences are required for good contrast between the gadolinium-enhanced and nonenhanced structures of the vessel wall. As plaque-component T1s after gadolinium injection should be lower than 1000 msec, a repetition time (TR) in the 400–500 msec range seems to be suitable to achieve good intraplaque contrast on turbo spin-echo (TSE) sequences. Standard T1W electrocardiograph (EKG)-triggered TSE sequences, commonly employed to reduce pulsation-related vessel wall motion in high-resolution carotid MRI (7–9), do not, however, allow such TR values, as cardiac synchronization precludes adjusting the TR of the sequence, which remains dependent on the patient's actual heart rate. This dependency of TR on heart rate may lead to suboptimal and highly variable T1-weighting. In our experience, patients referred for carotid plaque examination most often have heart rates ranging from 60 to 80 beats per minute (bpm) at rest, corresponding to a TR in the 1000–750 msec range. The TR issue could be solved by removing the cardiac synchronization from the sequence; but we believe that EKG is highly recommended for limiting motion artifacts (10) and taking full advantage of the very high resolution provided by present-day MR protocols and scanners.

We propose a simple MR approach, adding an intermediate radio frequency (RF) pulse to the standard EKG-triggered black-blood TSE T1W sequence, to obtain a fixed and shorter TR. The aim of the present study was to test the efficiency of the modified MR sequence against the standard sequence benchmark in enhancing contrast in *in vivo* intraplaque components.

<sup>1</sup>Department of Radiology, Hôpital Louis Pradel, Bron, Lyon, France.

<sup>2</sup>Philips Medical Systems, Suresnes, France.

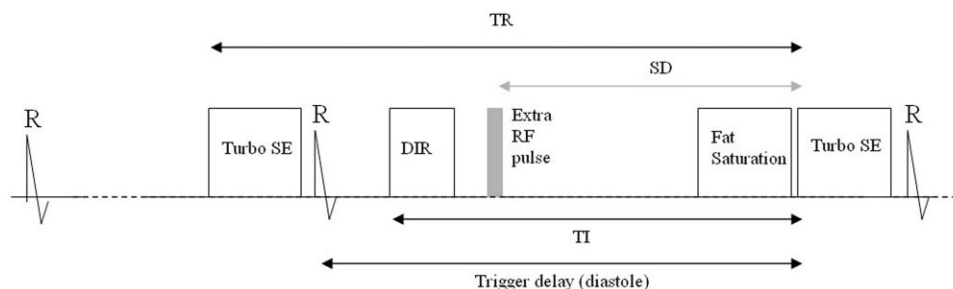
<sup>3</sup>Créatis-LRMN, UMR CNRS 5515, INSERM U630, Lyon, France.

\*Address reprint requests to: L.B., Service de Radiologie, Hôpital Cardiologique, 28 avenue Doyen Lépine, 69677 Bron, France.  
E-mail: loic.bousset@libertysurf.fr

Received September 9, 2006; Accepted July 3, 2007.

DOI 10.1002/jmri.21104

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



**Figure 1.** Diagram of the standard (black modules) and modified (black and gray modules) EKG-triggered black-blood TSE sequence. In the modified sequence, an extra nonselective saturation pulse ( $90^\circ$ ) is added during the back-blood delay (TI), changing the initial repetition time (TR) to 400 msec (SD) in order to achieve more optimal T1-weighting in postinjection carotid plaque imaging.

## MATERIALS AND METHODS

### Principle of the Modified T1W TSE Sequence

As shown in Fig. 1, the standard sequence used for carotid wall imaging typically consists of a black-blood module comprising a double inversion-recovery (DIR) block followed by an interval (TI). During this interval, a fat-saturation module is commonly performed. After the TI interval corresponding to the nulling of the blood signal, the TSE imaging module, comprising an excitation pulse (typically  $90^\circ$ ) followed by refocusing pulses, is applied. The TSE imaging module may basically be seen as a saturation-recovery technique, with TR as the saturation delay. The modification consisted in adding another saturation RF pulse immediately after the double-inversion pulses, to ensure a saturation delay that is constant, independent of heart rate, and shorter than the initial TR. The resultant saturation delay is referred to as SD. Given the range of typical patient heart rates (60–80 bpm), the typical black-blood delays were not shorter than 450 msec, so that the SD was fixed at a maximum of 400 msec. The extra RF pulse was a 2-msec nonselective  $90^\circ$ , three-lobe, sinc-Gauss shaped pulse, followed by crusher gradients to prevent unwanted stimulated echoes.

### Subjects

A total of 10 consecutive patients (five male and five female; age range = 74–53 years; mean age = 63 years) took part in the study. The inclusion criterion was an internal carotid plaque larger than 3 mm on computed tomography (CT) scan. Informed consent was obtained from all participants. The study was performed in compliance with the requirements of our institutional review board.

### MRI Experiments

MR exams were conducted on a 1.5T system (Intera<sup>®</sup>; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) using a surface coil (diameter = 47 mm) positioned on top of the mandibular angle. Both the normal (nT1-TSE) and modified (mT1-TSE) EKG-triggered black-blood T1-TSE sequences used identical acquisition parameters: TR = 700–1100 msec depending on the patient's heart rate; TE = 23 msec; matrix size =  $256 \times 153$  reconstructed to  $512$ ; field of view (FOV) =  $160 \times 96$  mm; echo train

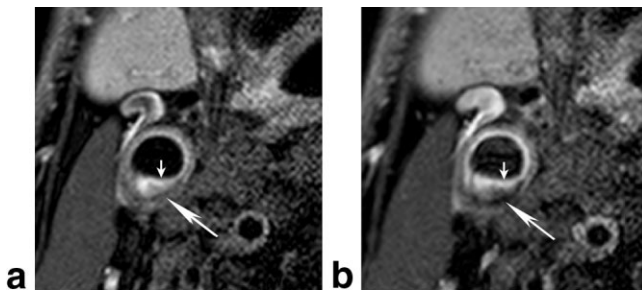
length = 9; slice thickness = 2 msec; and a scan average = 4, resulting in a total scan time of about 1.5 minutes per slice. Saturation delay was fixed to 400 msec for the modified T1-TSE sequence. For both sequences, a signal correction based on the reception-coil profile was applied to the images, homogenizing the signal over the region of interest. A total of three consecutive slices perpendicular to the carotid axis were acquired for each technique (nT1-TSE and mT1-TSE) at the same location, starting five minutes after 0.1 mmol/kg gadolinium injection (DOTAREM<sup>®</sup>; Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France). The center of the volume was positioned in the middle of the carotid plaque, previously located using a multislice axial and parasagittal steady-state free-precession sequence as well as 2D proton density-weighted spin-echo sequences. To limit the effect of gadolinium washout on contrast measurements within plaque components between the mT1-TSE and nT1-TSE sequences, images were acquired in an interleaved manner: nT1-TSE(slice 1)/mT1-TSE(slice 1), nT1-TSE(slice 2)/mT1-TSE(slice 2), and nT1-TSE(slice 3)/mT1-TSE(slice 3).

Finally, in order to evaluate the range of plaque T1s, a Look-Locker-like (11) sequence was performed in the middle of the plaque after contrast injection, using the following parameters: FOV =  $160 \times 160$  mm; matrix size =  $208 \times 208$  reconstructed to  $256$ ; slice thickness = 4 mm; echo planar imaging (EPI) factor = 15; flip angle =  $5^\circ$ ; number of sampled phases on the recovery curve = 16–25; and a scan average = 6, leading to a total acquisition time of less than two minutes.

To limit motion artifacts, the patient was asked to remain motionless and to swallow only between slice acquisitions.

### Image Analysis

Images were analyzed by two experienced observers with homemade software (DicomWorks<sup>®</sup>) (12). For each patient and each anatomic location, slices from the nT1-TSE and mT1-TSE sequences were first displayed simultaneously on-screen in a randomized position (left or right part of the screen), and, for each slice, the observer identified the highest and lowest signal areas in the carotid plaque. The mean value of the signal for each region was recorded. The intraplaque contrast be-



**Figure 2.** Comparison between the standard black-blood T1W TSE (a) and modified black-blood T1W TSE techniques (b) showing better intraplaque contrast between lipid core (large arrow) and the fibrous cap (small arrow) with the modified sequence.

tween low and high intraplaque signal areas was defined as:

$$C = \frac{SI(\text{High}) - SI(\text{Low})}{SI(\text{High})} * 100, \quad [1]$$

where SI(High) and SI(Low) are the mean value of the highest and lowest signal areas in the plaque for the two observers, respectively.

Second, images were displayed in random order and their quality was rated on a five-point scale (1 = not assessable, 2 = poor, 3 = moderate, 4 = good, and 5 = excellent) by each observer. The same scale was used to specifically rate the black blood quality.

Finally, in order to assess the T1 value of the plaque components, the totality of the plaque was contoured on the Look-Locker-like sequence for each patient (one slice per patient) by one observer. The T1 value of each pixel of the plaque was considered as  $T_{1\min}/\ln(2)$ , where  $T_{1\min}$  is the signal value of the time of inversion for which the value of the pixel was minimal and close to zero (the corrective term taking into account the excitation RF angle of the Look-Locker-like sequence was neglected for the purposes of T1 calculation). To evaluate the mean postcontrast T1 of plaques in the study population, the mean and standard deviation (SD) of the T1 values of all pixels of all plaques were calculated.

Heart rate and maximum plaque thickness were recorded for each slice.

## STATISTICAL ANALYSIS

The difference in intraplaque contrast between the two acquisition techniques was analyzed using a paired Student's *t*-test. A Bland-Altman representation was also performed (13). The Pearson interobserver coefficient of correlation for the contrast measurement and its significance was calculated.

Image quality was analyzed using the Wilcoxon signed rank test and kappa test for interobserver agreement.

All statistical analyses were made using the Medcalc® v 7.3.0.1 software package.

## RESULTS

All patients were evaluated. A total of 30 slices for each T1-TSE sequence were assessable, but three slices from three different patients were eliminated because of absence of plaque. Mean plaque thickness was 3.6 mm (range = 3–5.1). On the Look-Locker-like sequence, the mean postcontrast T1 for all plaques was measured as  $380 \pm 160$  msec (range = 63–1024).

Mean image quality was  $3.73 \pm 0.70$  for nT1-TSE and  $3.58 \pm 0.64$  for mT1-TSE ( $P = 0.09$ ) and  $3.73 \pm 0.70$  and  $3.58 \pm 0.64$ , respectively, ( $P = 0.086$ ) specifically regarding the black blood quality. The interobserver agreement kappa was 0.75.

Mean heart rate was 70 bpm (range = 54–84), giving a mean TR for the nT1-TSE sequence of 860 msec (range = 714–1111).

Post-gadolinium-injection intraplaque contrast was  $31.7 \pm 12.8\%$  with the original T1W sequence (nT1-TSE), and  $45.3 \pm 17.2\%$  with the modified T1W sequence (mT1-TSE), showing a significant contrast enhancement of 13.6% ( $P < 0.001$ ) (Figs. 2, 3, and 4). The interobserver coefficient of correlation for the contrast measurement was 0.88 ( $P < 0.0001$ ).

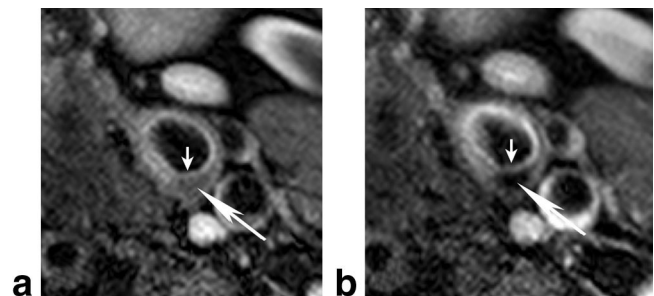
## DISCUSSION

Increasing the contrast between atheromatous plaque components is a major issue in cardiovascular MRI research. It would enable unstable plaque to be identified by differentiating the lipid core, associated with vulnerability, from the post-gadolinium-enhanced fibrous cap, considered as a factor of stability (4).

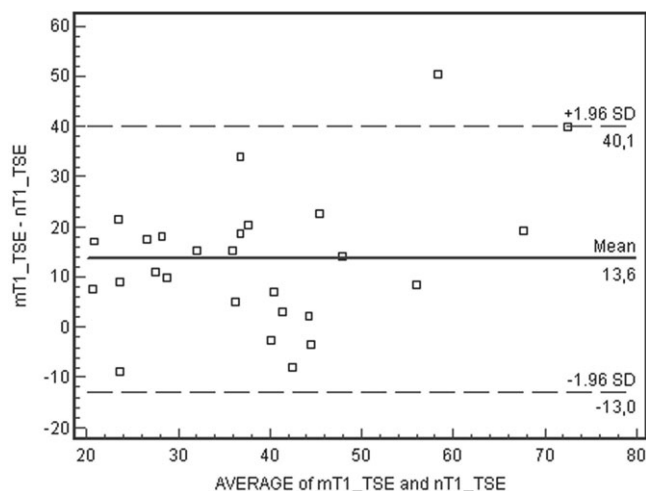
The present study demonstrated that adding a saturation pulse to the “standard” EKG-triggered black-blood T1W TSE sequence significantly (13.6%) enhanced intraplaque contrast after intravenous (IV) gadolinium injection.

Plaque T1 values were well below 1000 msec ( $380 \pm 166$  msec), confirming our initial assumption that a TR shorter than one cardiac cycle (RR interval) is required to optimize intraplaque T1 contrast after contrast-agent injection.

In addition, the mean TR of the standard EKG-triggered TSE sequence was 860 msec (range = 714–1111): shortening the TR to 400 msec improved contrast be-



**Figure 3.** Another patient with similar increase of intraplaque contrast between lipid core (large arrow) and the fibrous cap (small arrow) on standard (a) and modified (b) black-blood T1W TSE sequence.



**Figure 4.** Bland-Altman representation of intraplaque contrast difference between the modified black-blood T1W TSE (mT1-TSE) and the standard black-blood T1W TSE (nT1-TSE) techniques, showing an average contrast improvement of 13.6% between the two sequences.

tween short (gadolinium-enhanced) and long T1 plaque components.

Furthermore, the TR could be fixed, independently of heart rate, which could be of interest in patients with arrhythmia, for follow-up studies or in multicenter trials. The interest of an extra 90° pulse to obtain a heart-rate-independent black-blood sequence has already been reported by Ridgway et al (14) in a breathhold gradient echo sequence for heart imaging.

It is noteworthy that the extra RF pulse was applied within the same RR interval as the rest of the sequence, so that results were obtained with no increase in scan time.

Finally, as the extra RF pulse was followed by crusher gradients to prevent stimulated echoes in the signal of interest, no artifacts could be seen either in final images or in k-space. Furthermore, thanks to cardiac synchronization, there were no pulsation-related artifacts. Thus the mT1-TSE sequence combined both a strong, reproducible T1-weighting sequence and the use of cardiac synchronization.

Several solutions have been proposed to deal with high-resolution T1W imaging of vessel wall. The simplest solution is to fix the TR of the sequence, without using cardiac synchronization. For example, Cappendijk et al (15) are using non-EKG triggered T1W black-blood TSE imaging with a fixed TR = 570 msec to achieve a good T1 contrast in the vessel wall. These authors also used a non-EKG-triggered T1W gradient echo sequence, reported to be better than TSE sequences for analyzing plaque hemorrhage in noncontrast images. Similarly, Botnar et al (16) use a nontriggered T1W gradient echo sequence to demonstrate acute clot enhancement after injection of a fibrin-binding gadolinium-labeled peptide. Many other teams at 1.5T (17) and 3T (18) are using the same approach. But it is worth noting that they all use cardiac synchronization for T2W and proton-density black-blood TSE imaging (as TRs are compatible with patient heart rate),

which enforces the idea that EKG-triggering is important in image quality and its combination with T1-weighting is of interest. Indeed, in a previous study (10), we measured in 14 subjects the amplitude of the carotid wall motion and found a mean amplitude of 0.6 mm. This might seem of relatively low range regarding the image resolution (around 0.5 mm<sup>2</sup>) as asserted by Mani et al (19) but, in this same study, the range of wall motion was demonstrated to be highly variable (until 0.93 mm, SD = 0.19), which probably leads to image blurring.

Vasily et al. (20) and Yarnykh and Yuan (21) recently introduced a new sequence based on a quadruple inversion-recovery technique, giving a good black-blood effect with better T1-weighting of the sequence.

The images obtained with our modified technique remained of good quality in terms of black-blood properties, so that both the carotid wall and the plaque remained easily depicted for all patients, despite the fact that the extra RF pulse had been expected to degrade black-blood efficiency, as it breaks up the longitudinal magnetization recovery process that normally leads to blood-signal nulling at the time when the imaging excitation pulse is applied. Further control experiments using the same modified sequence but with no black-blood module were carried out (our unpublished results) and showed similar black-blood properties to the images obtained with the modified sequence and the DIR module, confirming that the blood darkening in our modified T1-TSE sequence came mainly from the relatively strong T1-weighting of the sequence. One way to further improve the technique and take advantage of the black-blood module would be to use an extra RF pulse that was slice-selective, so that it would not interfere with the black-blood process. This could combine the advantages of the black-blood efficiency of the DIR module and the T1 contrast enhancement brought about by the TR shortening achieved with the extra RF pulse.

Another limitation of our study is that we did not seek to assess the most effective saturation delay. We used 400 msec to achieve a strong T1 weighting, but other TR values could also be worth testing in particular if the delay between intravenous contrast injection and imaging changes.

It is to be noted that, in this study, intraplaque signal differences between highest and lowest intensity values were measured instead of contrast-to-noise ratio, because a signal homogeneity correction was systematically applied during image reconstruction, which yields a spatially-dependent noise figure. We believe, however, that this approach gave relevant information on plaque heterogeneity and thus, from a clinical point of view, represented a good assessment of the respective contrast efficiency of the normal and modified T1-TSE sequences.

In conclusion, the addition of an RF pulse to the standard EKG-triggered T1W TSE sequence enhanced intraplaque contrast without increasing sequence acquisition time. Furthermore, it appeared to be a robust technique, easy to implement on clinical scanners.

## REFERENCES

1. Serfaty JM, Chaabane L, Tabib A, Chevallier JM, Briguet A, Douek PC. Atherosclerotic plaques: classification and characterization with T2-weighted high-spatial-resolution MR imaging—an in vitro study. *Radiology* 2001;219:403–410.
2. Phan BA, Chu B, Kerwin WS, et al. Effect of contrast enhancement on the measurement of carotid arterial lumen and wall volume using MRI. *J Magn Reson Imaging* 2006;23:481–485.
3. Takaya N, Cai J, Ferguson MS, et al. Intra- and interreader reproducibility of magnetic resonance imaging for quantifying the lipid-rich necrotic core is improved with gadolinium contrast enhancement. *J Magn Reson Imaging* 2006;24:203–210.
4. Wasserman BA, Smith WI, Trout HH 3rd, Cannon RO 3rd, Balaban RS, Arai AE. Carotid artery atherosclerosis: in vivo morphologic characterization with gadolinium-enhanced double-oblique MR imaging initial results. *Radiology* 2002;223:566–573.
5. Yuan C, Kerwin WS, Ferguson MS, et al. Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *J Magn Reson Imaging* 2002;15:62–67.
6. Choudhury RP, Fuster V, Badimon JJ, Fisher EA, Fayad ZA. MRI and characterization of atherosclerotic plaque: emerging applications and molecular imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1065–1074.
7. Wasserman BA, Casal SG, Astor BC, Aletras AH, Arai AE. Wash-in kinetics for gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of carotid atheroma. *J Magn Reson Imaging* 2005;21:91–95.
8. Tang T, Howarth SP, Miller SR, et al. Assessment of inflammatory burden contralateral to the symptomatic carotid stenosis using high-resolution ultrasmall, superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI. *Stroke* 2006;37:2266–2270.
9. Leiner T, Gerretsen S, Botnar R, et al. Magnetic resonance imaging of atherosclerosis. *Eur Radiol* 2005;15:1087–1099.
10. Boussel L, Herigault G, de la Vega A, Nonent M, Douek PC, Serfaty JM. Swallowing, arterial pulsation, and breathing induce motion artifacts in carotid artery MRI. *J Magn Reson Imaging* 2006;23:413–415.
11. Look DC, Locker D. Time saving in measurement of NMR and EPR relaxation times. *Rev Sci Instrum* 1970;41:250–251.
12. Puech P, Boussel L. DicomWorks. Available at: <http://dicom.online.fr>. Last accessed: July 26, 2007.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307–310.
14. Ridgway JP, Kassner A, Sivananthan UM. Development of a heart-rate-independent pulse sequence for breath-hold MR imaging of the heart with black blood contrast. In: Proceedings of the 5th Annual Meeting of ISMRM, Vancouver, Canada, 1997 (Abstract 851).
15. Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, et al. Assessment of human atherosclerotic carotid plaque components with multi-sequence MR imaging: initial experience. *Radiology* 2005;234:487–492.
16. Botnar RM, Perez AS, Witte S, et al. In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent. *Circulation* 2004;109:2023–2029.
17. Honda M, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Morikawa M, Hayashi T. High-resolution magnetic resonance imaging for detection of carotid plaques. *Neurosurgery* 2006;58:338–346.
18. Hinton DP, Cury RC, Chan RC, et al. Bright and black blood imaging of the carotid bifurcation at 3.0T. *Eur J Radiol* 2006;57:403–411.
19. Mani V, Itskovich VV, Aguiar SH, et al. Comparison of gated and non-gated fast multislice black-blood carotid imaging using rapid extended coverage and inflow/outflow saturation techniques. *J Magn Reson Imaging* 2005;22:628–633.
20. Vasily L, Yarnykh VL, Yuan C. T1-insensitive flow suppression using quadruple inversion-recovery. *Magn Reson Med* 2002;48:899–905.
21. Yarnykh VL, Yuan C. Simultaneous outer volume and blood suppression by quadruple inversion-recovery. *Magn Reson Med* 2006;55:1083–1092.

## ANNEXE C

### **Publication n°3**

**Loffroy R, Bernard S, Sérusclat A, Boussel L, Bonnefoy E, D'Athis P,  
Moulin P, Revel D, Douek P.**

**Noninvasive Assessment of the Prevalence and Characteristics of Coronary  
Atherosclerotic Plaques by Multidetector Computed Tomography in  
Asymptomatic Type 2 Diabetic Patients at High Risk of Significant  
Coronary Artery Disease: a Preliminary Study.**

*Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102: 607-15.



 **Société Française de Cardiologie** ISSN 1675-2136

 **Archives of Cardiovascular Diseases**  
Formerly *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux*

<b>Scientific editorial</b>		<b>Absence of additional improvement in outcome of patients receiving cardiac resynchronization therapy paced at the most delayed left ventricular region</b>	
T2 cardiac magnetic resonance in infarct patients: <b>Stéphan</b> <b>or leader?</b> J. Garot, T. Hovasse, T. Untchseh, Y. Louvard, M.-C. Morice, J.-F. Plichoux and P. Garot <b>605</b>		A. Desjaigne, S. Laflotte, S. Reuter, P. Reant, S. Ploix, B. Mokrani, R. Roudaut, P. Jais, M. Hassaguerra, J. Clementy, P. DesSenne and P. Bordachar <b>641</b>	
<b>Clinical research</b>		<b>Review</b>	
Different patterns of left ventricular enlargement and long-term prognosis after reperfusion acute myocardial infarction J. Lipiecki, N. Danel, L. Ernandis, S. Moczy, A. Mofiz and J. Porzeczna <b>609</b>		Sleep apnoea in patients with heart failure. Part I: <b>Diagnosis, definitions, prevalence, pathophysiology and haemodynamic consequences</b> P. Bordier <b>651</b>	
Noninvasive assessment of the prevalence and characteristics of coronary atherosclerotic plaques by multidetector computed tomography in asymptomatic type 2 diabetic patients at high risk of significant coronary artery disease: A preliminary study R. Lefroy, S. Bernard, A. Sétauchi, L. Bousset, E. Bonneloy, P. D'Adhès, P. Moulin, D. Faveil and P. Douek <b>607</b>		<b>Images in cardiovascular medicine</b>	
Comparative analysis of neointimal coverage with pacifloxol and zotarolimus drug-eluting stents, using optical coherence tomography 6 months after implantation P. Minelli, C. Soudryand, S. Levesque, L. Duchêne, C. Dauphin, L. Sarry, J. Cassagnes and J.-R. Lussan <b>617</b>		Right atrial mass complicating aortic endocarditis P.-I. Massouh, L. Zapata and J.-L. Caumes <b>663</b>	
Prevalence of unknown peripheral arterial disease in patients with coronary artery disease: Data in primary care from the IPERION study S. Kowalick, J.-P. Cambou, P. Caroub, P. Léger, F. Luicy, M.-A. Hermann and P. Thélot <b>626</b>		Demonstration of bilateral superior vena cava by contrast echocardiography A. Bouze-Moquerra, O. Prada and N. Alvarez-Garcia <b>666</b>	
Cardiac magnetic resonance demonstrates myocardial oedema in remote tissue early after reperfusion myocardial infarction A. Manrique, E. Gerbaud, G. Durameaux, A. Cribier, D. Bertrand, A. Labon and J.-N. Dacher <b>633</b>		Mitral valve repair in acute extensive infectious endocarditis H. Müller, J. Sierra and R. Lerch <b>667</b>	
		Critical impact of pressure recovery on assessment of aortic valve stenosis M. Richardson-Lubbeek, P. Vladimir Ennecart and S. Maréchal <b>669</b>	
		<b>Corrigendum</b>	
		Corrigendum to "Palliative procedures for congenital heart defects" [ <i>Arch Cardiovasc Dis.</i> 102 (2009) 549-57] S.-M. Yoon and H. Jing <b>671</b>	

 **ELSEVIER MASSON** Tome 102 - nos. 8-9 - August-September 2009


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Available online at  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
www.em-consulte.com



## CLINICAL RESEARCH

# Noninvasive assessment of the prevalence and characteristics of coronary atherosclerotic plaques by multidetector computed tomography in asymptomatic type 2 diabetic patients at high risk of significant coronary artery disease: A preliminary study

Évaluation non invasive de la prévalence et des caractéristiques des plaques d'athérosclérose coronariennes par scanner multidétecteur chez des patients diabétiques de type 2 à haut risque de maladie coronarienne significative : une étude préliminaire

Romaric Loffroy<sup>a,\*</sup>, Sophie Bernard<sup>b</sup>,  
André Sérusclat<sup>a</sup>, Loïc Bousset<sup>a</sup>, Eric Bonnefoy<sup>c</sup>,  
Philippe D'Athis<sup>d</sup>, Philippe Moulin<sup>b</sup>, Didier Revel<sup>a</sup>,  
Philippe Douek<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiovascular Imaging, Louis-Pradel Hospital, LRMN Creatis, UMR CNRS 5515, Inserm U630, Claude-Bernard University, Lyon 1, 28 avenue du Doyen-Jean-Lépine, 69500 Lyon, France

<sup>b</sup> Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, Louis-Pradel University Hospital, Lyon, France

<sup>c</sup> Department of Cardiology and Intensive Care Unit, Louis Pradel University Hospital, Lyon, France

<sup>d</sup> Department of Medical Informatics and Biostatistics, Faculty of Medicine, Dijon, France

Received 20 January 2009; received in revised form 14 April 2009; accepted 15 April 2009  
Available online 25 June 2009

*Abbreviations:* CAC, Coronary artery calcification; CAD, Coronary artery disease; CRP, C-reactive protein; CT, Computed tomography; cIMT, Carotid intima-media thickness; MDCT, Multidetector computed tomography.

\* Corresponding author. Fax: +33 380 293 243.

E-mail address: [romaric.loffroy@chu-dijon.fr](mailto:romaric.loffroy@chu-dijon.fr) (R. Loffroy).

**KEYWORDS**

Type 2 diabetes mellitus;  
Multidetector computed tomography;  
Coronary artery disease;  
Atherosclerotic plaque

**MOTS CLÉS**

Diabète de type 2 ;  
Scanner multidétecteur ;  
Maladie coronarienne ;  
Plaque d'athérosclérose

**Summary**

**Background.** – There is a need to identify diabetic patients at risk of cardiovascular events before symptom onset.

**Aims.** – To evaluate the prevalence and characteristics of coronary atherosclerotic plaques in asymptomatic type 2 diabetic patients with coronary risk factors but without known coronary artery disease, using multidetector computed tomography.

**Methods.** – High-resolution 40-slice coronary computed tomography was performed prospectively in 42 consecutive type 2 diabetic patients (mean age 62 years; range 50–77 years; 28 men) with over one or more carotid atherosclerotic plaque and no coronary artery disease symptoms. Computed tomography data were evaluated for calcium score and the presence of coronary plaques. Plaque type, distribution, extensive character and obstructive nature were determined per patient for each segment.

**Results.** – No plaques were detected in 11 (26.2%) patients. Atherosclerotic plaques were detected in 31 (73.8%) patients. A total of 147 coronary segments with plaque were identified, of which 11 (7.5%) contained hypodense plaques, 28 (19%) mixed plaques and 108 (73.5%) calcified plaques. Hypodense plaques were noted in 4/15 (26.7%) patients without coronary calcifications. Most calcified and hypodense plaques resulted in lumen narrowing of less than 50%; most mixed plaques resulted in lumen narrowing greater than 50%. Obstructive disease was detected in 9/11 patients with a high calcium score (> 400).

**Conclusion.** – This preliminary study demonstrates that a high proportion of asymptomatic type 2 diabetic patients present without coronary plaques detectable by multidetector computed tomography, despite concomitant carotid atherosclerotic lesions. Computed tomography seems to detect a high proportion of plaques compared with conventional angiography in these specific patients.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Résumé**

**Contexte.** – Il y a un intérêt à identifier les patients diabétiques à risque d'événements cardiovasculaires avant le début des symptômes.

**Objectifs.** – Évaluer la prévalence et les caractéristiques des plaques d'athérosclérose coronariennes chez des patients asymptomatiques diabétiques de type 2 à risque coronarien mais sans atteinte coronarienne connue par scanner multibarrette.

**Méthodes.** – Un coroscanner 40 détecteurs a été réalisé de manière prospective chez 42 patients consécutifs diabétiques de type 2 (28 hommes ; âge moyen, 62 ans ; extrêmes, 50–77 ans) ayant au moins une plaque d'athérosclérose carotidienne et asymptomatiques sur un plan coronarien. Le score calcique et la présence de plaques coronariennes ont été évalués à partir des données scannographiques. Le type, la distribution le caractère extensif et la nature obstructive des plaques ont été déterminés par patient pour chaque segment.

**Résultats.** – Aucune plaque coronarienne n'a été détectée chez 11 (26,2%) patients. La présence de plaques d'athérosclérose a été détectée chez 31 (73,8%) patients. Un total de 147 segments coronaires avec des plaques ont été identifiés, parmi lesquels 11 (7,5%) contenaient des plaques hypodenses, 28 (19%) des plaques mixtes et 108 (73,5%) des plaques calciques. La présence de plaques hypodenses était notée chez quatre (26,7%) des 15 patients qui n'avaient pas de calcifications coronariennes. La majorité des plaques calcifiées et hypodenses étaient non obstructives alors que la majorité des plaques mixtes étaient obstructives. La présence d'une maladie obstructive a été notée chez neuf des 11 patients avec un score calcique élevé (> 400).

**Conclusion.** – Cette étude préliminaire démontre qu'une proportion élevée de patients diabétiques de type 2 asymptomatiques ne présentent aucune plaque coronarienne détectable par scanner multidétecteur malgré la présence concomitante de lésions d'athérosclérose carotidiennes. Le scanner semble détecter une proportion importante de plaques coronariennes en comparaison à l'angiographie conventionnelle dans cette population particulière.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Background**

Diabetic patients experience increased morbidity and cardiovascular complications compared with non-diabetic

subjects [1–3], and coronary artery lesions have been proven angiographically to be more extensive and CAD has a worse prognosis [4,5]. Moreover, silent myocardial ischaemia occurs more frequently in diabetic patients than

in the general population and can lead to delayed diagnosis [6–8]. In addition, even after normal noninvasive stress testing, event rates are still higher in diabetic patients than in non-diabetic individuals [9,10], which is probably related to differences in coronary plaque burden and composition. Consequently, direct noninvasive imaging of coronary atherosclerotic plaques with MDCT has become a useful tool in the detection of both calcified and vulnerable non-calcified coronary lesions, in contrast to calcium scoring alone, and may allow improved cardiovascular risk stratification [11–14]. Recent reports have even demonstrated the ability of contrast-enhanced MDCT to detect differences in coronary plaque characteristics between patients with and without symptomatic diabetes [15]. However, the prevalence and characteristics of coronary plaques detected by MDCT in asymptomatic type 2 diabetic patients have not been evaluated systematically. The aim of our preliminary cross-sectional study was to assess prospectively the potential of MDCT to detect coronary artery plaques in asymptomatic type 2 diabetic patients without known CAD but considered to be at high risk of CAD because of the presence of carotid atherosclerotic lesions, and to study plaque prevalence, extent and characteristics.

## Methods

### Study subjects

The study population consisted of 42 consecutive type 2 diabetic patients (28 men; 14 women; mean age 62.1 years; range 50–77 years) in primary prevention without known symptoms suggestive of CAD, who were recruited prospectively from an endocrinology department between May 2006 and April 2007. All participants were required to have a carotid atherosclerotic plaque greater or equal to 1.5 mm thick at inclusion to increase the probability of finding coronary plaques. This threshold was set arbitrarily to ensure the selection of diabetic patients with a carotid atherosclerotic plaque that was sufficiently thick to be examined by high-resolution magnetic resonance imaging – a criterion that was part of another study that aimed to identify the different components of plaques with magnetic resonance imaging. Inclusion criteria were the presence of type 2 diabetes diagnosed according to the American Diabetes Association criteria (symptoms of diabetes and a casual plasma glucose level of greater than or equal to 11.1 mmol/L or a fasting plasma glucose level of greater than or equal to 7.0 mmol/L) [16], age at onset greater than or equal to 35 years, current age greater than or equal to 50 years, no personal history of CAD and normal electrocardiogram at rest. Exclusion criteria were age at onset of diabetes of less than 35 years, current age less than 50 years, pregnancy, known CAD, Cockcroft and Gault creatinine clearance less than 50 mL/min and arrhythmia that did not allow electrocardiogram-triggering of the MDCT scan. All study-related data, including patient history, laboratory results and MDCT findings were analysed. The study protocol was approved by the local research ethics committee and all patients gave written informed consent before inclusion in the study.

### MDCT data acquisition

All examinations were performed using a MDCT scan (Brilliance 40, Philips Medical Systems, Eindhoven, the Netherlands). First, a native prospective scan without contrast enhancement was performed to determine the total calcium burden of the coronary tree (sequential scan with  $32 \times 0.6$  mm collimation, tube current 60 mAs at 120 kV), followed by 40-slice contrast-enhanced CT coronary angiography performed with the use of a retrospective electrocardiogram-triggered spiral scan of the whole heart area with the following parameters:  $40 \times 0.625$  mm collimation, 420 ms gantry rotation, pitch of 0.2, tube voltage at 120 kV, maximum current of 600–800 mAs depending on patient size, half-scan reconstruction mode and imaging craniocaudal direction. Tube current was modulated according to the electrocardiogram. The average radiation dose received for the study was approximately of 7 mSv. Contrast agent (80 mL Iomeron [400 mg iodine/mL], Bracco Altana Pharma, Milan, Italy) was injected intravenously at a rate of 4–6 mL/s. Twenty-five (59.5%) of the 42 enrolled patients had a heart rate greater than or equal to 65 beats/min at the moment of the CT scan, and received metoprolol 5–20 mg intravenously before the examination. Transaxial image reconstruction was performed routinely using a window centred at 75% of the R-R interval to coincide with left ventricular diastole. For heart rates greater than or equal to 70 beats/min, an earlier reconstruction phase (40%) was used (coinciding with isovolumic relaxation). The position of the reconstruction window within the cardiac cycle was optimized individually to minimize motion artefacts. Image quality was good enough to allow analysis of MDCT data in all patients.

### MDCT image interpretation

Cardiac MDCT image evaluation was performed independently on a separate workstation (Brilliance workstation, Philips Medical Systems, Eindhoven, the Netherlands) by two reviewers who were unaware of the clinical data. In cases where disagreement occurred, agreement was reached in a joint reading. A total Agatston calcium score was recorded for each patient. MDCT angiograms were analysed visually by assessment of the axial slices, the multiplanar reformations along the axis of the vessel of interest, the cross-sectional images perpendicular to the vessel centre line and the three thin-slab maximum intensity projections. The coronary artery tree was divided into 15 segments according to the American Heart Association classification [17]. In our analysis, segments were separated into proximal (1, 5, 6 and 11) and distal (2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 and 15) segments. Healthy segments were defined as those without any plaque and diseased segments as those containing non-calcified, mixed or calcified plaques. One coronary plaque was assigned per coronary segment. Plaques were classified as obstructive or non-obstructive using a 50% threshold of luminal narrowing. The presence of obstructive and non-obstructive CAD in one vessel (single-vessel disease) or in two or three vessels (multivessel disease) was also evaluated. The presence of non-calcified or hypodense plaques was defined as any discernible protrusive structure in the coronary artery wall with a CT density less than the contrast-

enhanced coronary lumen but greater than the surrounding connective tissue. Calcified atherosclerotic plaques were defined as plaques with high density exceeding the threshold of 130 Hounsfield units. In other words, any isolated coronary artery wall calcification was considered to be a calcified coronary plaque, whatever its protrusion in the lumen. Mixed plaques were defined as plaques with non-calcified and calcified components within the same plaque. Plaques were also classified as extensive and non-extensive using a 50% threshold of length spreading.

### Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation and were compared using the two-tailed *t* test for independent samples. When not distributed normally, continuous variables are expressed as median (interquartile range) and were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. Categorical variables are expressed as number (percentage) and compared between groups with the  $\chi^2$  or Fisher's exact test. All statistical analyses were performed using Triomphe software [18] and Stata software (StataCorp, 2005; Stata statistical software: release 9.0. College Station, TX, USA). For all analyses, a *p*-value of less than 0.05 was considered to be the threshold of significance.

### Results

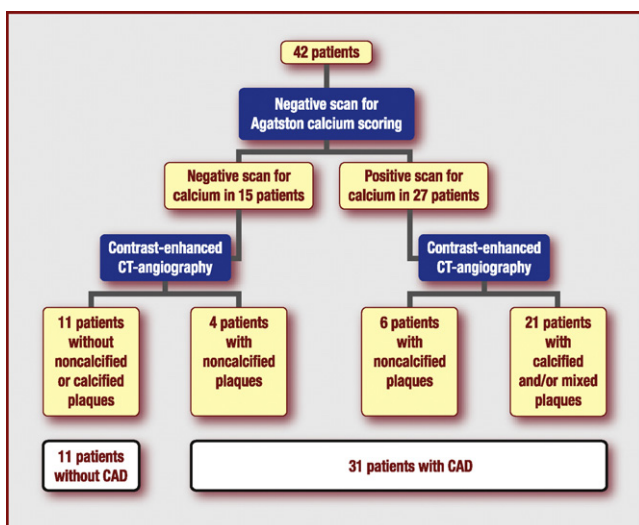
A coronary MDCT investigation was performed in 42 type 2 diabetic patients and a total of 630 coronary segments were included in the analysis. The general characteristics of the study population are summarized in Table 1. Diabetes in our series was treated as in the overall diabetic population; all patients had oral antidiabetic medication or insulin therapy. No coronary calcifications were present in 15 of 42 (35.7%) patients, whereas calcified plaques were noted in 27 of 42 (64.3%) patients (Fig. 1). Subsequent contrast-enhanced coronary CT angiography revealed the presence of

**Table 1** Characteristics of our study population of 42 patients.

Characteristic	Data
Age (years)	62.1 ± 7.9
Men	28 (66.7)
Duration of diabetes (years)	14.2 ± 8.4
Smoking	5 (11.9)
Arterial hypertension	32 (76.2)
Weight (kg)	83.5 ± 13.4
Waist circumference (cm)	101 ± 11.2
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	29.1 ± 4.7
Plasma triglycerides (g/L)	1.46 ± 0.95
Total cholesterol (g/L)	1.80 ± 0.38
High-density lipoprotein cholesterol (g/L)	0.54 ± 0.17
Low-density lipoprotein cholesterol (g/L)	0.98 ± 0.28
C-reactive protein (mg/L)	3.42 ± 3.24
Carotid intima-media thickness (mm)	0.843 ± 0.133
Glycosylated haemoglobin (g/L)	8.13 ± 1.57
Microalbuminuria	13 (30.9)
Creatinine clearance <sup>a</sup> (mL/min)	98.3 ± 23.9

Results are given as mean ± standard deviation or *n* (percentage).

<sup>a</sup> According to Cockcroft and Gault formula.



**Figure 1.** Prevalence of calcified and non-calcified plaques in the study group. CAD: coronary artery disease; CT: computed tomography.

non-calcified plaques in four of 15 (26.7%) patients who had no coronary calcifications. In these patients, non-calcified plaques were the only manifestation of CAD. The overall prevalence of patients with non-calcified plaques as the only manifestation of CAD was 9.5% (4/42 patients). In patients with coronary calcifications, additional non-calcified plaques were detected in six of 27 (22.2%) patients.

In summary, CAD because of the presence of calcified or non-calcified plaques was detected in a total of 31 (73.8%) patients. In the remaining 11 (26.2%) patients, CAD was completely absent on MDCT. The proportion of men was significantly higher in patients with CAD (sex-ratio 3.4) and in patients with calcified plaques (sex-ratio 4.2) compared with in patients without CAD (sex-ratio 0.57) and without calcified plaques (sex-ratio 0.77), respectively. Patients with CAD, calcified plaques or non-calcified plaques were characterized by slightly higher total cholesterol and low-density lipoprotein concentrations. In addition, patients with CAD or calcified plaques were characterized by a trend of having a greater CIMT than patients with non-calcified plaques. Finally, the mean glycosylated haemoglobin level was significantly higher in patients with CAD than in those without CAD (mean 8.90 ± 1.29 g/L vs 7.86 ± 1.57 g/L; *p* < 0.05). Table 2 summarizes the clinical and biological characteristics of diabetic patients with and without CAD in more detail.

A total Agatston calcium score of zero or 1–10 was observed in 15 (35.7%) and no (0%) patients, respectively. A calcium score of 11–100 was observed in nine (21.4%) patients, while a score of 101–400 or greater than 400 was identified in seven (16.7%) and 11 (26.2%) patients, respectively. The presence of obstructive disease was noted

**Table 2** Clinical and biological characteristics of diabetic patients with and without coronary artery disease.

	Patients with CAD ( <i>n</i> = 31)	Patients without CAD ( <i>n</i> = 11)	<i>p</i>
Age (years)	62.6 ± 7.5	60.7 ± 8.7	0.55
Men	24 (77.4)	4 (36.4)	0.024
Duration of diabetes (years)	13.9 ± 8.4	15.1 ± 9.5	0.81
Smoking	4 (12.9)	1 (9.1)	1.00
Arterial hypertension	23 (74.2)	9 (81.8)	0.71
Waist circumference (cm)	101.6 ± 11.5	99.4 ± 11.2	0.71
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	28.6 ± 4.1	30.6 ± 6.2	0.56
Plasmatic triglycerides (g/L)	1.47 ± 0.99	1.40 ± 0.82	1.00
Total cholesterol (g/L)	1.84 ± 0.38	1.68 ± 0.19	0.20
High-density lipoprotein cholesterol (g/L)	0.54 ± 0.17	0.54 ± 0.15	0.62
Low-density lipoprotein cholesterol (g/L)	1 ± 0.29	0.91 ± 0.26	0.30
C-reactive protein (mg/L)	3.32 ± 3.45	3.48 ± 2.67	0.50
Carotid intima-media thickness (mm)	0.855 ± 0.143	0.809 ± 0.096	0.39
Glycosylated haemoglobin (g/L)	8.90 ± 1.29	7.86 ± 1.57	0.03

Results are given as mean ± standard deviation or *n* (percentage).  
*p* < 0.05 was statistically significant.  
CAD: coronary artery disease

in nine of 11 patients with a high calcium score (>400). The mean number of diseased segments and the mean number of segments containing calcified plaques were significantly higher in men than in women:  $4.53 \pm 3.8$  versus  $1.35 \pm 1.78$  ( $p < 0.05$ ) and  $3.46 \pm 3.3$  versus  $0.78 \pm 1.18$  ( $p < 0.05$ ), respectively. In the 31 (73.8%) patients with CAD, 147 (31.6%) coronary segments with plaques were observed among a total of 465 coronary segments. Of the segments containing plaques, 114 (77.5%) showed non-obstructive CAD and 33 (22.5%) showed obstructive CAD. Single-vessel disease was observed in 6/12 (50%) patients with obstructive CAD; the other six (50%) patients with obstructive CAD had multivessel disease. Most calcified ( $n = 96$ ; 88.9%) and non-calcified ( $n = 10$ ; 90.9%) plaques resulted in lumen narrowing of less than 50%, whereas most mixed plaques ( $n = 20$ ; 71.4%) resulted in lumen narrowing in more than 50%. Of the segments containing non-obstructive plaques, 85 (74.6%) showed non-extensive and 29 (25.4%) showed extensive CAD, whereas six (18.2%) and 27 (81.8%) segments with obstructive plaques contained non-extensive and extensive plaques, respectively. In general, non-calcified plaques were observed in 11 (7.5%) segments, mixed plaques in 28 (19%) segments, and calcified plaques in 108 (73.5%) segments. Most segments with calcified ( $n = 64$ ; 59.3%) or mixed ( $n = 16$ ; 57.2%) plaques were distal segments, whereas most segments with non-calcified plaques ( $n = 7$ ; 63.6%) were proximal segments. Table 3 summarizes the distribution of coronary plaques according to their characteristics.

## Discussion

As CAD is the major cause of the morbidity, mortality and medical cost of diabetes [19], early diagnosis of CAD to prevent progression and clinical events has intuitive appeal. Several studies have documented the ability of MDCT to visualize coronary atherosclerotic plaques in vivo [20–24]. Possible applications in the risk stratification of asymp-

tomatic individuals have been discussed but require close scrutiny of the actual ability of MDCT to detect non-stenotic coronary plaques. Our study shows, firstly, that in asymptomatic subjects considered at high risk of CAD because of type 2 diabetes and the concomitant presence of a significant carotid atherosclerotic plaque, CAD is completely absent on MDCT in a high proportion (26.2%) of patients. These patients were characterized by a trend of having lower total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol concentrations and a smaller cIMT. This observation supports the fact that cIMT is a marker of atherosclerosis burden, as reported previously [25], and that increased cIMT in diabetes is associated with risk factors for atherosclerosis, and even with coronary and cerebral vascular events [26]. In addition, in the 31 (73.8%) patients with CAD, 147 (31.6%) coronary segments with plaques were observed among a total of 465 coronary segments, meaning that atheromatous burden per patient was slightly low and that our study population was at lower risk than was thought. However, the control of diabetes was statistically worse in patients with CAD than in patients without CAD (mean glycosylated haemoglobin level  $8.90 \pm 1.29$  vs  $7.86 \pm 1.57$ , respectively;  $p < 0.05$ ), which may represent a confounding factor in our study.

Sex was associated significantly with increased CAD and CAC in our study. Age and smoking were also associated with increased CAD and CAC, but the association did not reach statistical significance, probably because of the small number of patients. The volume of CAC is an excellent marker of overall atherosclerotic burden [27,28]. Calcium deposition occurs only when atherosclerosis is present and more severe plaques tend to have a greater amount of calcium [29]. Therefore, higher CAC scores are associated with a higher likelihood of significant coronary stenosis, whereas the absence of CAC is associated with a very low likelihood of obstructive CAD. In our population-based study, 16 of 42 (38.1%) asymptomatic subjects had some evidence of CAC, whereas 11 of 42 (26.2%) had a CAC score greater than 400.

**Table 3** Multidetector computed tomography coronary plaque distribution and characteristics in the whole study population.

	Segments with calcified plaques (n = 108; 73.5%)		Segments with mixed plaques (n = 28; 19%)		Segments with non-calcified plaques (n = 11; 7.5%)	
	Proximal <sup>a</sup> (n = 44; 40.7%)	Distal <sup>b</sup> (n = 64; 59.3%)	Proximal <sup>a</sup> (n = 12; 42.8%)	Distal <sup>b</sup> (n = 16; 57.2%)	Proximal <sup>a</sup> (n = 7; 63.6%)	Distal <sup>b</sup> (n = 4; 36.4%)
<b>Segments with non-obstructive plaques (n = 114; 77.5%)</b>						
Non-extensive (n = 85; 74.6%)	30	44	3	1	3	4
Extensive (n = 29; 25.4%)	9	13	2	2	3	0
<b>Segments with obstructive plaques (n = 33; 22.5%)</b>						
Non-extensive (n = 6; 18.2%)	0	0	2	4	0	0
Extensive (n = 27; 81.8%)	5	7	5	9	1	0

<sup>a</sup> Segments 1, 5, 6 and 11.

<sup>b</sup> Segments 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 and 15.

This proportion is higher than in non-diabetic patients, as reported by Schurgin et al. [30], who screened a cohort of 139 asymptomatic diabetic patients and matched control subjects. They concluded that extensive CAC (calcium score > 400) was more prevalent (25.9%) in diabetic patients than non-diabetic control subjects both without (7.2%) and with (14%) traditional risk factors. These findings are of interest, as a calcium score higher than 400 is associated with a high risk of myocardial perfusion impairment [31] and a high risk of any cardiovascular event in the short term [32]. In our study, the presence of obstructive disease was noted in nine of 11 patients with a high calcium score (> 400). In fact, 27 of 33 (81.8%) obstructive plaques were extensive.

Several studies have shown that the coronary artery calcium score is valuable in identifying patients with a high likelihood of inducible myocardial ischaemia [31,33]. These studies have observed consistently that the likelihood of ischaemia in patients with a calcium score less than 100 is negligible, whereas those with a score greater than or equal to 400 have a relatively high likelihood of inducible ischaemia. Anand et al. [34] studied asymptomatic patients with diabetes and confirmed the higher incidence of inducible ischaemia in patients with higher calcium scores. Nearly one third of those patients had a calcium score higher than 400, 28% of whom had large ischaemic defects. On the other hand, our prospective study indicated that mixed and non-calcified coronary plaques and their characteristics can be detected accurately with 40-slice CT angiography. In addition, our study showed that non-calcified coronary plaques, alone or in combination with calcifications, can also be detected in a high proportion of asymptomatic type 2 diabetic patients. Furthermore, our study demonstrated that non-calcified coronary plaques were the only manifestation of CAD in 9.5% of the study population (or in 26.7% of patients with a negative score for coronary calcifications). These findings demonstrate that calcium scoring with a prospective scan without contrast enhancement is not sufficient to determine the presence of coronary plaques. Patients with a high cardiovascular risk, as in our study, should have contrast-enhanced CT coronary angiography in cases of negative scan for calcium. Indeed, in a recent population study of 70 asymptomatic patients with type 2 diabetes, Scholte et al. [35] showed a relatively high proportion (41%) of non-calcified plaques detected by MDCT. Importantly, a calcium score less than 10 did not exclude CAD in these patients. The author concluded that MDCT might be a useful technique for identifying CAD in asymptomatic patients with type 2 diabetes with incremental value over calcium scoring.

The identification of patients at increased risk of an ischaemic and potentially fatal cardiac event is a difficult task in cardiovascular medicine. Despite extensive studies and the development of several risk-prediction models, traditional cardiovascular risk factors fail to predict the development of CAD in a large group of patients [36]. MDCT angiography has been introduced as a noninvasive technique for the reliable detection of coronary stenosis in addition to quantification of calcified plaque burden [37]. With the improved spatial resolution, CT angiography also allows for the detection of mixed and non-calcified coronary plaques. Sensitivity and specificity of 78% and 87–92%, respectively, have been reported by Leber et al. [13] and Achenbach et al. [11] for 16-slice CT for the detection of

non-calcified plaques, alone or in combination with calcified plaques, compared with intravascular ultrasound. Of interest, patients with non-calcified plaques were characterized by a trend of having higher total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and CRP levels. Although no association between CRP and the calcified plaque burden was found in the Study of Inherited Risk of Coronary Atherosclerosis [38], Hausleiter et al. [39] demonstrated that CRP values were significantly higher in patients with non-calcified plaques and that these elevated values correlated with earlier non-calcified stages of atherosclerotic plaque development, supporting the association of the inflammatory burden with increased cardiovascular risk [40].

Noninvasive atherosclerosis imaging techniques might further enhance the detection and management of patients at risk of coronary heart disease, but they are not perfect. It is recognized that a 'detection gap' exists, defined as the difference between coronary heart disease cases or events currently detected and the total burden of disease or events among the population [41]. This leaves room for the introduction of the noninvasive atherosclerosis CT imaging technique. Romeo et al. [42] used MDCT in 168 asymptomatic high-risk subjects (age  $60 \pm 7$  years) and found that the prevalence of significant CAD (>50% diameter stenosis) was 27%. Most of these subjects were diabetic (60%), 36% of whom had evidence of significant CAD. These subjects might benefit from coronary revascularization, although studies demonstrating that revascularization might improve prognosis in asymptomatic subjects are lacking. Well-designed studies need to be conducted to provide substantial evidence that CT coronary imaging has an independent predictive value in addition to common risk factors.

Of interest, a very high proportion of mixed plaques (71.4%) were obstructive in our study compared with calcified (11.1%) or non-calcified (9.1%) plaques. Accordingly, calcium scores may underestimate total coronary plaque burden to a higher extent in patients with diabetes. MDCT coronary angiography may therefore have substantial incremental value over coronary calcium scoring, although this concept needs further study. In our study, MDCT coronary angiography allowed the identification of two phenotypically different groups of diabetic patients with or without non-calcified plaques despite an identical cardiovascular risk (clinical and biological characteristics not statistically different). Nevertheless, Pundziute et al. [15] reported a significantly lower proportion of mixed coronary plaques in patients with diabetes (23%) than in patients without diabetes (38%), suggesting a more rapid development of atherosclerosis in the presence of diabetes, with faster progression from non-calcified lesions to completely calcified lesions. The proportion of mixed coronary plaques in patients with diabetes was quite similar in our study (19%). However, the most frequently obstructive character of mixed plaques was not obvious in this study. In addition, most segments with calcified (59.3%) or mixed (57.2%) plaques were distal segments, whereas most segments with non-calcified plaques (63.6%) were proximal segments. These findings could be attributed to better visualization of non-calcified plaques in proximal coronary vessels than in smaller distal segments on CT angiography.

Our study had some limitations. Firstly, this population-based study was biased, so the prevalence of coronary

plaques can only be valid in this particular population and probably cannot be extended to the French standard diabetic population. Notably, all patients had at least one carotid atherosclerotic plaque at inclusion, considering arbitrarily and intuitively that it was an additional cardiovascular risk factor. Secondly, examinations were performed at a single time point and were not repeated over time. Also, MDCT angiograms were evaluated visually, as no reliable quantitative algorithms are currently available. Therefore, long-term follow-up data, not yet available in our study, are needed to determine whether the MDCT observations can provide prognostic information and be of potential use in the identification of diabetic patients at different levels of cardiovascular risk. Because of the relatively small number of patients, we could not draw definitive conclusions on the prevalence of coronary plaques by CT in our diabetic population and we could not evaluate significantly the effect of risk factors on coronary plaque characteristics. Further studies with larger populations should be conducted to clarify this important issue, as well as to confirm the predictive value of mild calcifications and non-calcified plaques for hard coronary events, particularly in type 2 diabetic patients without symptoms. On the other hand, the visualization of non-calcified plaques by MDCT is limited by plaque and vessel size; smaller plaques located predominantly in smaller coronary arteries may therefore be difficult to identify accurately with the current generation of CT scanners. Finally, the possible benefits of coronary plaque detection by MDCT need to be weighed against the potential hazards associated with the radiation dose delivered to the chest and the necessity for administration of intravenous contrast media.

## Conclusions

Our study provides the first assessment of the accuracy of MDCT in detecting and quantifying coronary atherosclerotic plaques in a subgroup of particular asymptomatic type 2 diabetic patients at high risk of coronary disease. Notably, CT seems to detect a high proportion of coronary plaques compared with conventional angiography in these specific patients. However, the precise role of MDCT in the diagnostic work-up of patients with suspected CAD in relation to existing noninvasive functional tests is not yet established and, to date, the technique is not indicated clinically for coronary plaque detection in asymptomatic diabetic patients.

## References

- [1] Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002;287:2570–81.
- [2] Guize L, Pannier B, Thomas F, et al. Recent advances in metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2008;101:577–83.
- [3] Hammar N, Sandberg E, Larsen FF, et al. Comparison of early and late mortality in men and women after isolated coronary artery bypass graft surgery in Stockholm, Sweden, 1980 to 1989. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:659–64.
- [4] Melchior T, Kober L, Madsen CR, et al. Accelerating impact of diabetes mellitus on mortality in the years following an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999;20:973–8.



- [5] Saely CH, Aczel S, Marte T, et al. Cardiovascular complications in Type 2 diabetes mellitus depend on the coronary angiographic state rather than on the diabetic state. *Diabetologia* 2004;47:145–6.
- [6] Milan Study on Atherosclerosis, Diabetes (MiSAD) Group. Prevalence of unrecognized silent myocardial ischemia its association with atherosclerotic risk factors in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1997;79:134–9.
- [7] Koistinen MJ. Prevalence of asymptomatic myocardial ischaemia in diabetic subjects. *BMJ* 1990;301:92–5.
- [8] Weiner DA, Ryan TJ, Parsons L, et al. Significance of silent myocardial ischemia during exercise testing in patients with diabetes mellitus: a report from the Coronary Artery Surgery Study (CASS) Registry. *Am J Cardiol* 1991;68:729–34.
- [9] Giri S, Shaw LJ, Murthy DR, et al. Impact of diabetes on the risk stratification using stress single-photon emission computed tomography myocardial perfusion imaging in patients with symptoms suggestive of coronary artery disease. *Circulation* 2002;105:32–40.
- [10] Underwood SR, Anagnostopoulos C, Cerqueira M, et al. Myocardial perfusion scintigraphy: the evidence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:261–91.
- [11] Achenbach S, Moselewski F, Ropers D, et al. Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography: a segment-based comparison with intravascular ultrasound. *Circulation* 2004;109:14–7.
- [12] Leber AW, Becker A, Knez A, et al. Accuracy of 64-slice computed tomography to classify and quantify plaque volumes in the proximal coronary system: a comparative study using intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:672–7.
- [13] Leber AW, Knez A, Becker A, et al. Accuracy of multidetector spiral computed tomography in identifying and differentiating the composition of coronary atherosclerotic plaques: a comparative study with intracoronary ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1241–7.
- [14] Schroeder S, Kopp AF, Baumbach A, et al. Noninvasive detection and evaluation of atherosclerotic coronary plaques with multi-slice computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1430–5.
- [15] Pundziute G, Schuijff JD, Jukema JW, et al. Noninvasive assessment of plaque characteristics with multislice computed tomography coronary angiography in symptomatic diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1113–9.
- [16] The American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27(Suppl. 1):S5–S10.
- [17] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association. *Circulation* 1975;51:5–40.
- [18] Gex-Fabry M, Balant LP. Considerations on data analysis using computer methods and currently available software for personal computers. In: Welling P, Balant H, editors. *Pharmacokinetics of drugs: handbook of experimental pharmacology*, 110. New York: Springer; 1994. p. 507–27.
- [19] Hogan P, Dall T, Nikolov P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 2003;26:917–32.
- [20] Becker CR, Knez A, Ohnesorge B, et al. Imaging of noncalcified coronary plaques using helical CT with retrospective ECG gating. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175:423–4.
- [21] Becker CR, Nikolaou K, Muders M, et al. Ex vivo coronary atherosclerotic plaque characterization with multi-detector-row CT. *Eur Radiol* 2003;13:2094–8.
- [22] Leber AW, Knez A, White CW, et al. Composition of coronary atherosclerotic plaques in patients with acute myocardial infarction and stable angina pectoris determined by contrast-enhanced multislice computed tomography. *Am J Cardiol* 2003;91:714–8.
- [23] Nikolaou K, Sagmeister S, Knez A, et al. Multidetector-row computed tomography of the coronary arteries: predictive value and quantitative assessment of non-calcified vessel-wall changes. *Eur Radiol* 2003;13:2505–12.
- [24] Schoenhagen P, Tuzcu EM, Stillman AE, et al. Non-invasive assessment of plaque morphology and remodeling in mildly stenotic coronary segments: comparison of 16-slice computed tomography and intravascular ultrasound. *Coron Artery Dis* 2003;14:459–62.
- [25] Mitsuhashi N, Onuma T, Kubo S, et al. Coronary artery disease and carotid artery intima-media thickness in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002;25:1308–12.
- [26] O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14–22.
- [27] Agatston AS, Janowitz WR, Kaplan G, et al. Ultrafast computed tomography-detected coronary calcium reflects the angiographic extent of coronary arterial atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1994;74:1272–4.
- [28] Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, et al. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation* 1995;92:2157–62.
- [29] Wexler L, Brundage B, Crouse J, et al. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1996;94:1175–92.
- [30] Schurgin S, Rich S, Mazzone T. Increased prevalence of significant coronary artery calcification in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:335–8.
- [31] He ZX, Hedrick TD, Pratt CM, et al. Severity of coronary artery calcification by electron beam computed tomography predicts silent myocardial ischemia. *Circulation* 2000;101:244–51.
- [32] Raggi P, Callister TQ, Coil B, et al. Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation* 2000;101:850–5.
- [33] Berman DS, Wong ND, Gransar H, et al. Relationship between stress-induced myocardial ischemia and atherosclerosis measured by coronary calcium tomography. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:923–30.
- [34] Anand DV, Lim E, Hopkins D, et al. Risk stratification in uncomplicated type 2 diabetes: prospective evaluation of the combined use of coronary artery calcium imaging and selective myocardial perfusion scintigraphy. *Eur Heart J* 2006;27:713–21.
- [35] Scholte AJ, Schuijff JD, Kharagjitsingh AV, et al. Prevalence of coronary artery disease and plaque morphology assessed by multi-slice computed tomography coronary angiography and calcium scoring in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *Heart* 2008;94:290–5.
- [36] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003;108:1772–8.
- [37] Ohnesorge BM, Hofmann LK, Flohr TG, et al. CT for imaging coronary artery disease: defining the paradigm for its application. *Int J Cardiovasc Imaging* 2005;21:85–104.
- [38] Reilly MP, Wolfe ML, Localio AR, et al. C-reactive protein and coronary artery calcification: The Study of Inherited Risk of Coronary Atherosclerosis (SIRCA). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1851–6.
- [39] Hausleiter J, Meyer T, Hadamitzky M, et al. Prevalence of non-calcified coronary plaques by 64-slice computed tomography in patients with an intermediate risk for significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:312–8.

- [40] Ridker PM, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation* 2004;109:1955–9.
- [41] Taylor AJ, Merz CN, Udelson JE. 34th Bethesda Conference: Executive summary - can atherosclerosis imaging techniques improve the detection of patients at risk for ischemic heart disease? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1860–2.
- [42] Romeo F, Leo R, Clementi F, et al. Multislice computed tomography in an asymptomatic high-risk population. *Am J Cardiol* 2007;99:325–8.

## ANNEXE D

### **Publication n°4**

**Bernard S, Loffroy R, Sérusclat A, Bussel L, Bonnefoy E, Thévenon C,  
Rabilloud M, Revel D, Moulin P, Douek P.**

**Increased Levels of Endothelial Microparticles CD144 (VE-Cadherin)  
Positives in Type 2 Diabetic Patients with Coronary Noncalcified Plaques  
Evaluated by Multidetector Computed Tomography (MDCT).**

*Atherosclerosis* 2009; 203: 429-35.



## Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT)

Sophie Bernard<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Romaric Loffroy<sup>e</sup>, André Sérusclat<sup>e</sup>, Loïc Boussel<sup>e</sup>, Eric Bonnefoy<sup>f,g</sup>, Chantal Thévenon<sup>g</sup>, Muriel Rabilloud<sup>g,h</sup>, Didier Revel<sup>e,g</sup>, Philippe Moulin<sup>a,b,c,d,g</sup>, Philippe Douek<sup>e,g</sup>

<sup>a</sup> Endocrinology, Diabetes and Nutrition Department, Cardiovascular Hospital, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Lyon, France

<sup>b</sup> INSERM, U870, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>c</sup> INRA, UMR1235, F-69600 Oullins, France

<sup>d</sup> INSA-Lyon, RMND, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>e</sup> Radiology Department, Cardiovascular Hospital, Hospices Civils de Lyon, Creatis-Lrnm CNRS UMR 5220, Inserm U 630, France

<sup>f</sup> Intensive Care Unit, Cardiovascular Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>g</sup> Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France

<sup>h</sup> Biostatistics Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 February 2008

Received in revised form 31 July 2008

Accepted 31 July 2008

Available online 12 August 2008

#### Keywords:

Type 2 diabetes

Microparticles

Noncalcified plaques

### ABSTRACT

**Objective:** The combination of both morphological and cellular markers of subclinical atherosclerosis, in addition to conventional risk factors, may help to improve cardiovascular prevention in type 2 diabetic patients. The aim of our cross-sectional study was to evidence a putative increase in endothelial (EMP) or platelet (PMP) microparticles, in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques detected by multidetector CT (MDCT).

**Methods and results:** Microparticles and coronary MDCT were assessed in 56 type 2 diabetic patients with different cardiovascular risk levels. Both EMP ( $r=0.35$ ,  $p=0.022$ ) and PMP ( $\rho=0.34$ ,  $p=0.022$ ) were correlated with hsCRP. EMP were elevated in patients with acute coronary syndromes ( $p=0.034$ ). EMP count was significantly higher in the presence of noncalcified diseased segments ( $p=0.01$ ). By contrast, there was no association between hsCRP and noncalcified atheroma. This increase in EMP in noncalcified diseased segment carriers remained borderline significant after adjustment for coronary heart disease and hsCRP. Conversely, there was no association of PMP count with noncalcified diseased segments and no difference in PMP count between patients with and without acute coronary syndrome. No significant association between either EMP and PMP counts and mixed or calcified diseased segments was observed. **Conclusions:** We report for the first time an association between plasma EMP-CD144+ and coronary noncalcified plaques assessed by MDCT in a population of type 2 diabetic patients. EMP might be used as a surrogate marker of unstable plaques, and might help to improve cardiovascular prediction in diabetic patients with intermediate risk.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The incidence of cardiovascular disease is at least three times higher in diabetic than in non-diabetic populations, and 50–75% of diabetic patients die from coronary artery disease (CAD) [1,2]. Coronary artery lesions are more extensive and CAD has a worse prognosis than in non-diabetic subjects [3]. Moreover, silent

myocardial ischemia is more frequent in diabetics than in the general population, and can lead to delayed diagnosis [4]. Current guidelines recommend considering diabetes mellitus as a coronary artery disease equivalent [5]. Nonetheless, in a prospective diabetic cohort, Bernard et al. have found that diabetic patients with low Framingham score and no elevated carotid intima-media thickness had a low risk of coronary events during the 5-year follow-up period [6]. Moreover, Raggi et al. have shown in a large cohort that diabetic patients with no coronary artery calcium had a short-term all-cause mortality risk similar to patients with no diabetes and no coronary artery calcium [7]. This subgroup of patients represented 30% of the diabetic patients in this cohort. Therefore, since cardiovascular risk

\* Corresponding author at: Unit 11 Hôpital Cardiovasculaire 28, avenue Doyen Lépine, 69677 Bron Cedex, France. Tel.: +33 472681301; fax: +33 472681307.

E-mail address: [sophie.bernard@chu-lyon.fr](mailto:sophie.bernard@chu-lyon.fr) (S. Bernard).

is heterogeneous in type 2 diabetes, the development of surrogate markers of cardiovascular disease might be helpful to improve risk assessment in order to identify diabetic patients with the highest risk and treat them intensively.

Computed tomography (CT) has been largely used during the last 2 decades for coronary assessment. Electron beam CT (EBCT) remains the standard reference for coronary artery calcified plaque assessment [8,9]. Coronary calcium score has a high negative predictive value but a poor positive predictive value for detection of coronary stenosis compared to coronary angiography. Multidetector CT (MDCT) is the current standard method for coronary CT angiography allowing noncalcified plaque detection [10,11]. Noncalcified plaques detected by CT could reflect vulnerable plaques potentially prone to rupture [12,13]. Recently, Pundziute et al. reported that the number of segments with noncalcified plaques detected by MDCT was an independent predictor of coronary events in patients at high risk of CAD [14].

In order to improve risk stratification, the combination of both morphological and cellular parameters could provide further information. Microparticles (MP) are generated by cell activation or apoptosis induced by different stimuli [15,16]. MP are defined as circulating particles with a size range between 0.2 and 1  $\mu\text{m}$ . Their cellular origin is determined by specific monoclonal antibodies. An increase in plasma MP has been reported in the presence of cardiovascular risk factors (diabetes, hypertension and dyslipidemia) [17–19]. Elevated endothelial MP plasma levels are associated with both humeral and coronary endothelial dysfunction [20,21]. Furthermore, elevated endothelial MP has been reported in patients with CAD assessed by coronary angiography, or in patients with acute coronary syndrome (ACS) [22–24] and could represent a marker of coronary artery disease.

The principal aim of our cross-sectional study was to evidence a putative increase in platelet (PMP) and endothelial (EMP) microparticles in type 2 diabetic patients according to the characteristics of coronary artery plaques detected by MDCT. They were stratified by rising cardiovascular risk: group I: asymptomatic patients without metabolic syndrome, group II: asymptomatic patients with metabolic syndrome and group III: patients with ACS. The hypothesis was that MP occurrence would be associated with noncalcified plaques and gradually increasing from group I to group III. The second aim of our study was to assess the correlation of MP and CT parameters with more common intermediate risk markers like hsCRP, and carotid intima-media thickness (IMT).

## 2. Methods

### 2.1. Patients

The study population comprised asymptomatic type 2 diabetic patients without metabolic syndrome: group I ( $n=31$ ) and with metabolic syndrome: group II ( $n=16$ ) recruited in the department of endocrinology and diabetes metabolism. An additional subgroup of 9 type 2 diabetic patients with an ACS was recruited in the intensive care unit: group III.

#### 2.1.1. Inclusion criteria

For all groups: males and females aged 50 years or more, with type 2 diabetes (age at diagnosis  $>35$ , two fasted glycemia  $>126$  mg/dl or glycemia  $>200$  mg/dl after oral glucose challenge test or treatment with oral antidiabetic agents or/and insulin).

All patients should have a carotid plaque (1.5-mm thick at least) at inclusion to increase the probability of finding coronary plaques. Before inclusion, all patients gave written informed consent about

the study protocol which was approved by our local ethics committee.

For group II: all the patients should have three of the following features of metabolic syndrome: according to the Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program (ATPIII-NCEP) [5]: waist circumference  $>102$  cm in men and  $>88$  cm in women; fasting serum triglycerides  $\geq 150$  mg/dl; High-density lipoprotein (HDL) cholesterol  $<40$  mg/dl in men and  $<50$  mg/dl in women; high blood pressure: systolic blood pressure  $\geq 130$  mmHg and/or diastolic blood pressure  $\geq 85$  mmHg or antihypertensive drug treatment.

For group III: ACS was defined by two measurements of troponin I at least 6 h apart showing a rising or a falling pattern during the first 24 h after the clinical cardiac ischemia symptoms with or without ECG modifications [25].

#### 2.1.2. Exclusion criteria

For all groups: Diagnosis of diabetes before age of 35 years, calculated Cockcroft renal clearance  $<50$  ml/min, cardiac arrhythmia. For group I: presence of metabolic syndrome. For groups I and II: presence of cardiovascular symptoms, abnormal ECG.

In group III, all patients had coronary revascularization at admission with implantation of active coronary stent at the culprit site. No patient had more than one stent. For practical reasons, it was impossible to obtain blood for MP assessment at admission before the coronary angiography and the MDCT scan was performed the day following admission in the intensive care unit.

### 2.2. Measurement of carotid IMT

Ultrasonographic scanning of the carotid arteries was performed using high-resolution B mode ultrasound (Sequoia S 512 Acuson Siemens Mountainview CA, USA) with an electrical linear transducer (8L5, 8 MHz). The patient was in the supine position; his head rotated  $45^\circ$  away from the side being scanned. A special preset of machine setup was used for all the patients, the general gain and TGC were always the same and not modified during examination. ECG was recorded to select frames at end diastole (foot of QRS wave). Transversal and longitudinal sweeps were used to locate the carotid arteries, the plaques (more than 1.5 mm or an encroachment more than 50% of the thickness of the adjacent wall) and the jugular vein. The carotid was then placed in a longitudinal view. The angle of insonation on the neck was the transjugular view, or if not possible,  $45^\circ$ . The common carotid had to be exactly perpendicular to US beam. The image had to display the IMT boundaries as well on near and far wall to make sure that the US beam was in the center of the vessel, and the walls had to be parallel from the beginning to the end of the common carotid. The end of common carotid was defined as the point where it begins to dilate (bulb). The acoustical focus was placed on the far wall. The segment of interest was the far wall of the last centimeter of common carotid artery. If there was a plaque in this area or an acoustical shadow, the segment of interest was the centimeter proximal to the plaque on the common carotid. Each measure was the mean of 16 determinations performed in the region of interest of both common carotid arteries as defined above and as previously described [26]. A second measure was done with off-line software (MATH'SR Métris Paris France).

All the measurements were performed by the same experienced physician. The intraindividual variation coefficient was tested in two control groups. In the first one, including 12 healthy subjects (mean age,  $26 \pm 5$  years), IMT (measured twice at  $28 \pm 6.2$  days interval) was  $0.54 \pm 0.07$  mm, with a coefficient of variation of  $6.55 \pm 1.8\%$ . In the second group, comprising 10 diabetic patients (mean age  $62 \pm 2$  years) with elevated IMT ( $0.89 \pm 0.04$  mm), the

coefficient of variation was  $5.2 \pm 0.7\%$  for two IMT determinations performed at  $3.6 \pm 0.6$  days interval.

### 2.3. MDCT coronary angiography

MDCT data acquisition: MDCT scan was performed on a Brilliance 40 machine (Philips Medical Systems, Eindhoven, The Netherlands) with intravenous injection of 1 ml/kg of Iomeron 400 (Bracco, Milano, Italy) at a rate of 4–6 ml/s. A retrospective EKG triggered CT scan of the whole heart area was performed with the following parameters: number of detectors 40; individual detector width 0.625 mm; gantry rotation time 420 ms; pitch 0.2; half-scan reconstruction mode and imaging cranio-caudal direction. Scanning was triggered to start automatically when a predetermined level of contrast enhancement was detected in the descending aorta (bolus tracking). Scanning was performed with tube voltage at 120 kV and maximum current of 600–800 mA depending on patient size.

Reconstruction was performed routinely using a window centered at 75% of the R–R interval to coincide with left ventricular diastole. For heart rates  $\geq 70$  beats/min, an earlier reconstruction phase (40%) was used (coinciding with isovolumic relaxation). If motion artefact appeared, additional reconstruction phases were analysed. Cardiac MDCT image evaluation was performed on a Philips work station (Brilliance Workstation, Philips Medical Systems, Eindhoven, The Netherlands). Reconstructed images were viewed in multiple formats: original axial slice curved multiplanar reformations along the axis of the vessel of interest, cross-sectional images perpendicular to the vessel center line, and thin-slab maximum intensity projections. The coronary artery tree was segmented according to the modified American Heart Association classification [27].

In seven patients, MDCT did not provide technically adequate images (respiratory motion, irregular heart rate), so these patients were not included in the analysis of MDCT data. The proportion of patients with poor quality imaging was low and similar between groups: 4, 2, and 1 patients in group I, II and III, respectively.

Determination of calcium score: a native scan without contrast dye was performed to determine the coronary artery calcium score (total Agatston score).

Characteristics of plaques: MDCT angiograms were analysed by two observers by consensus decision. They were blinded to the clinical data. Healthy segments were defined as segments without any plaque and diseased segments as segments containing either non-calcified, mixed or calcified atheroma. The coronary segment with stent was not analysed and indeed the characteristics of the culprit lesion could not be described.

The presence of noncalcified atheroma was defined as any discernible structure in the coronary artery wall with a CT density less than the contrast-enhanced coronary lumen but greater than the surrounding connective tissue. Calcified atheroma was characterized by high density exceeding the threshold of 130 Hounsfield units (HU). Furthermore, a hypointense area in the vicinity of a calcified plaque was not assigned as noncalcified atheroma but considered as an artefact. Mixed diseased segment was defined as having noncalcified and calcified components within a same segment.

### 2.4. Microparticle quantification

Five milliliter of 12-h fasting blood were withdrawn on a citrated tube. Within 1 h after withdrawal, samples were centrifuged at  $1500 \times g$  for 20 min at  $20^\circ$ . Supernatant (corresponding to platelet poor plasma) was put into aliquots of 500 ml and then frozen at  $-80^\circ$ .

After thawing, 30  $\mu$ l of platelet poor plasma were incubated for 20 min in the dark with 4  $\mu$ l of fluorescein (FITC)-conjugated monoclonal antibody against CD41 (GPIIb) (Beckmann) or 6  $\mu$ l of phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody against CD144 (VE-Cadherin) (Beckmann) for determination of platelet and endothelial MP, respectively. After incubation, samples were diluted in 900 ml of PBS. To assess non-specific binding of antibodies, non-immunized FITC- and PE-labeled isotype-matched mouse monoclonal IgG served as negative controls. Immediately before flow cytometry analysis 30  $\mu$ l of flow count beads (Beckmann) were added to microparticle quantitation. MP were defined as CD41+ or CD144+ particles with size  $< 1 \mu$ m. All samples were assayed in triplicate. Intra-assay variations were 4.5% and 3.7%, for EMP and PMP, respectively. Inter-assay variations were 8.9% and 7.5%, for EMP and PMP, respectively. We measured also MP in six healthy controls (three males, three females, aged  $41 \pm 5$  years).

### 2.5. Biological parameters

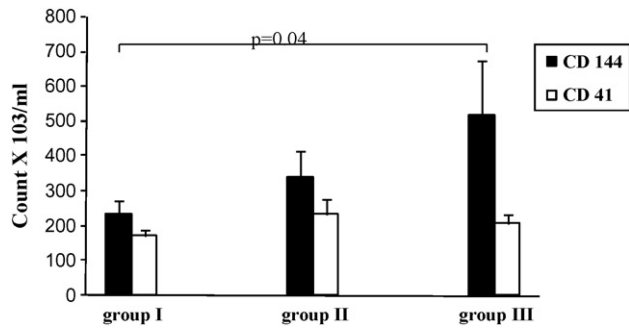
Blood samples were drawn, after an overnight fast, into tubes containing EDTA, and plasma was immediately separated by low-speed centrifugation. HbA1c levels were determined by HPLC method. HDL containing fractions were obtained by direct method (Architect Abbott). Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were determined using commercial kits (Abbott). LDLc was calculated by Friedewald formula. hsCRP was measured by immunonephelometry (Dade Behring).

### 2.6. Statistical analysis

#### 2.6.1. Statistical analysis was validated by an independent statistician

Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  S.D. or as median and interquartiles range for variables not normally distributed such as Agatston score, EMP, PMP, and hsCRP. Categorical variables are expressed as frequency and percent. To compare continuous variables between the three groups of patients, the non-parametric Kruskal–Wallis test for independent groups was used because the number of patients was small and some variables were not normally distributed. To compare the association of continuous variables and binary categorical variables, the non-parametric Mann–Whitney test was used. To compare categorical variables between groups, we used a  $\chi^2$  test; an exact test could not be made for more than two independent groups with SPSS software. To compare two groups between them and obtain a Fischer exact test, we excluded alternatively the third group of the analysis. If there was no significant difference between groups, we have given the global  $\chi^2$  value and  $p$  in the text or in Tables. If there was a significant difference between groups (by analysis two by two), we have given these results (Fischer exact test) in the text or in legend of the tables. Correlations were calculated with Spearman's rank correlation test.

The statistical analysis of coronary atheroma was made by comparing total number of diseased segments per patient, number of diseased segments with calcified, noncalcified and mixed atheroma per patient between groups (Kruskal–Wallis). The presence of three types of diseased segments was also assessed as a binary outcome and the proportions of patients with one or more diseased segments with calcified, noncalcified and mixed atheroma were calculated and compared by  $\chi^2$  tests as described above. To test the independence of the association between EMP and the presence of noncalcified diseased segments, we performed a multivariate logistic regression analysis with noncalcified diseased segments as a binary outcome. Not normally distributed variables EMP, and hsCRP were log transformed for this analysis.



**Fig. 1.** Endothelial (EMP-CD144+) and platelet (PMP-CD41+) microparticle counts according to group.  $p=0.04$  for EMP and  $p=0.33$  for PMP between groups (Kruskal–Wallis test).

A  $p$  value  $<0.05$  was considered significant for all tests. All analyses were performed by SPSS 12.0 software.

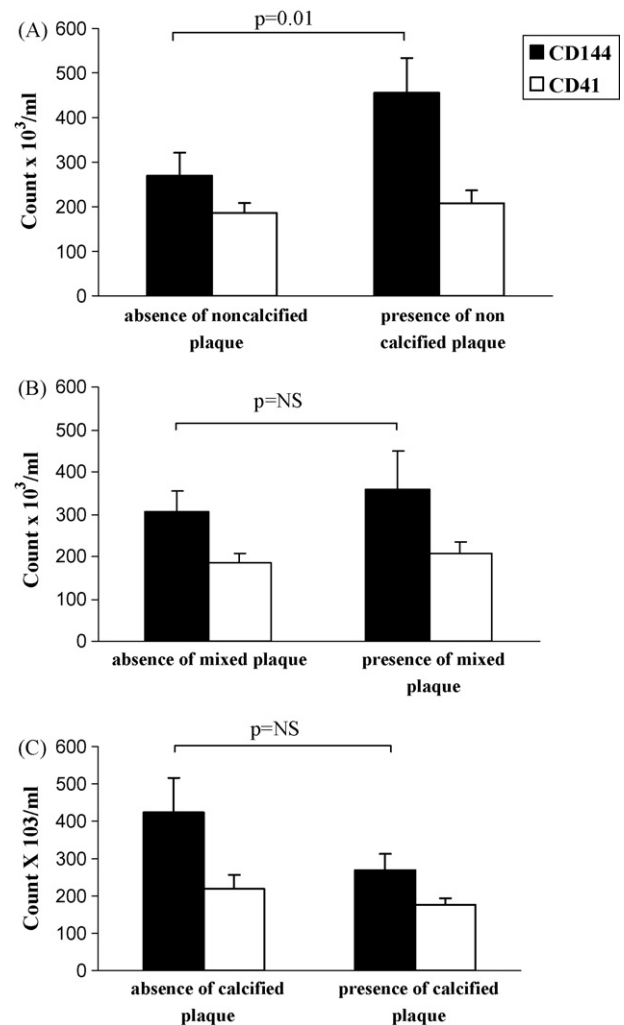
### 3. Results

The characteristics of patients are presented in Table 1. Subjects with ACS were slightly older with an HbA1c mildly increased compared with patients in primary prevention. In addition, the proportion of regular smokers was significantly higher in patients with ACS. Duration of diabetes was similar between groups. As expected according to inclusion criteria, group II (patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome) had increased waist circumference, BMI, plasma TG concentration, and lower HDLc and were more frequently hypertensives. In Table 2, diabetes and cardiovascular treatments are reported. There were more patients with statin and beta-blocker treatments in group III and more patients with diuretic treatments in group II.

In group III, hsCRP was strongly increased compared to groups II and I (Kruskal–Wallis,  $\chi^2 = 14.21$ ,  $p = 0.001$ ) (Table 3). Carotid IMT was different between groups: lowest in group I, intermediate in group II, and highest in group III (Kruskal–Wallis,  $\chi^2 = 6.95$ ,  $p = 0.03$ ) (Table 3).

The proportion of patients with noncalcified diseased segments increased from group I to group III, and the difference was significant for comparison between groups I (15.4%) and III (57.1%) ( $\chi^2 = 5.24$ , exact Fischer test:  $p = 0.04$ ) but not significant for comparison between groups I (15.4%) and II (37.5%) ( $\chi^2 = 2.67$ , exact Fischer test:  $p = 0.14$ ) and between group II (37.5%) and III (57.1%) ( $\chi^2 = 0.76$ , exact Fischer test:  $p = 0.65$ ). The presence of mixed or calcified diseased segments was observed in a similar frequency between groups. Mixed diseased segments were observed in 38.5%, 25%, and 42.9% of patients in groups I, II and III, respectively. Calcified diseased segments were noted in 61.5%, 62.5%, 71.4% of patients in groups I, II and III, respectively. Calcium score was significantly higher in group III (Kruskal–Wallis,  $\chi^2 = 6.20$ ,  $p = 0.04$ ) (Table 3) and was associated with calcified (Mann–Whitney,  $p = 0.0001$ ) and mixed diseased segments (Mann–Whitney,  $p = 0.0001$ ) but not with noncalcified diseased segments (Mann–Whitney,  $p = 0.85$ ). Calcium score was correlated with age ( $\rho = 0.354$ ,  $p = 0.037$ ), and carotid IMT ( $\rho = 0.394$ ,  $p = 0.019$ ).

Compared to group I, healthy controls had significantly lower EMP and PMP (Table 3). EMP microparticles were significantly higher in group III than in group I (Kruskal–Wallis,  $\chi^2 = 6.36$ ,  $p = 0.04$ ) (Table 3, Fig. 1). By contrast, PMP microparticle counts were similar between groups (Kruskal–Wallis,  $\chi^2 = 2.22$ ,  $p = 0.33$ ) (Table 3, Fig. 1). EMP and PMP were significantly and positively correlated ( $\rho = 0.593$ ,  $p = 0.0001$ ). hsCRP was positively correlated with EMP ( $\rho = 0.354$ ,  $p = 0.02$ ) and PMP ( $\rho = 0.344$ ,  $p = 0.02$ ). EMP count



**Fig. 2.** Association between endothelial (EMP-CD144+) and platelet (PMP-CD41+) microparticles and characteristics of coronary atheroma: (A) noncalcified diseased segments ( $p=0.01$  for EMP, and  $p=0.33$  for PMP, Mann–Whitney); (B) mixed diseased segments ( $p=0.79$  for EMP and  $p=0.37$  for PMP, Mann–Whitney); (C) calcified diseased segments ( $p=0.33$  for EMP and  $p=0.35$  for PMP, Mann–Whitney).

only was significantly associated with noncalcified diseased segments (expressed as a binary outcome) (Mann–Whitney,  $p = 0.01$ ) (Fig. 2A). By contrast, there was no association between hsCRP and noncalcified atheroma (Mann–Whitney,  $p = 0.125$ ). This increase of EMP in patients with noncalcified diseased segments remained borderline significant after adjustment for group ( $\exp(B) = 6.5$ , CI: 0.99–51.52,  $p = 0.0459$ ) and hsCRP ( $\exp(B) = 6.8$ , CI: 0.89–56.52,  $p = 0.0548$ ). PMP was not associated with noncalcified diseased segments (Mann–Whitney,  $p = 0.33$ ) (Fig. 2A). There was no correlation between calcium score and EMP ( $\rho = 0.058$ ,  $p = 0.71$ ) or PMP ( $\rho = 0.01$ ,  $p = 0.99$ ). Finally, there was no significant association between either EMP or PMP and mixed (Fig. 2B) or calcified plaques (Fig. 2C).

### 4. Discussion

We report, for the first time, an association between plasma EMP-CD144+ and coronary noncalcified atheroma assessed by MDCT in a population of type 2 diabetic patients. EMP were characterized using anti-CD144 (VE-cadherin) antibody since it is the most specific marker for endothelial cells, and since it was established that CD144-positive EMP derived selectively from human

**Table 1**  
Characteristics of patients

	Group I (n = 31)	Group II (n = 16)	Group III (n = 9)	p <sup>a</sup>
Sex (F/M)	12/19	6/10	6/3	0.288
Age (years)	62.00 ± 8.17	62.81 ± 7.20	65.78 ± 9.03	0.58 (1.07)
Duration of diabetes (years)	15.00 ± 9.75	12.31 ± 5.22	11.40 ± 11.11	0.43 (1.69)
Smokers (%)	5 (16.1)	1 (6.3)	5 (55.6)	0.009
Hypertensives (%)	20 (64.5)	15 (93.8)	5 (55.6)	0.073
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.69 ± 5.37	30.07 ± 3.31	30.64 ± 5.52	0.16 (3.62)
Waist circumference (cm)	97 ± 12.1	107 ± 9.6	107 ± 13.3	0.004 (10.83)
HbA1c (%)	7.89 ± 1.41	8.66 ± 1.60	9.17 ± 2.29	0.15 (3.8)
TG (g/l)	0.92 ± 0.35	2.36 ± 0.88	1.55 ± 1.03	0.0001 (25.45)
HDLc (g/l)	0.62 ± 0.16	0.42 ± 0.66	0.61 ± 0.20	0.0001 (22.24)
LDLc (g/l)	0.95 ± 0.29	1.06 ± 0.25	1.22 ± 0.55	0.35 (2.08)

For continuous variables results are expressed as mean ± S.D.

<sup>a</sup> The value of  $\chi^2$  for Kruskal–Wallis test is given in parenthesis.

**Table 2**  
Diabetes and cardiovascular treatments between groups

	Group I (n = 31)	Group II (n = 16)	Group III (n = 9)	p <sup>a</sup>
Diabetes treatments				
Antidiabetic drugs				0.38 (7.48)
Diet alone	1	0	1	
Oral antidiabetic agents	15	5	2	
Oral antidiabetic agents + insulin	6	8	3	
Insulin	9	3	3	
Cardiovascular medications				
Statins	19	11	9	0.09 (4.95) <sup>*</sup>
Antiplatelet agents	21	12	9	0.14 (3.87)
ACE or ARA2 inhibitors	21	14	8	0.20 (3.19)
Diuretics	9	12	3	0.009 (9.5) <sup>*</sup>
Beta-blockers	3	2	9	0.0001 (32.21) <sup>*</sup>
Calcium antagonists	5	2	0	0.44 (1.66)

<sup>a</sup>  $\chi^2$  values in parenthesis.

<sup>\*</sup> Statistical significant difference with exact Fischer test:  $p = 0.037$  ( $\chi^2 = 4.98$ ) between groups I and III for statins;  $p = 0.005$  ( $\chi^2 = 9.02$ ) between groups I and II for diuretics;  $p = 0.001$  ( $\chi^2 = 27.1$ ) between groups I and III and  $p = 0.001$  ( $\chi^2 = 17.9$ ) between groups II and III for beta-blockers.

endothelial cells [19]. As previously reported by other groups, we found an increase in MP in diabetic patients compared with non-diabetic controls [17–19].

We took advantage of the combination of both cellular and morphologic markers to ascertain the interest of MP measurement in type 2 diabetic patients with different cardiovascular risk level. We report a significant elevation of EMP CD144+ in type 2 diabetic patients with ACS compared with type 2 diabetic patients without metabolic syndrome. Patients with metabolic syndrome had intermediate levels of EMP but close to patients without metabolic syndrome. There was an overlap of EMP between groups which might be related in part to variability of MP measurement. There

were also some expected discrepancies between groups in terms of oral drugs: loading dose of clopidogrel and more beta-blocker treatments in patients with ACS, more diuretic treatments in patients with metabolic syndrome in relation with hypertension. There are very few data in the literature regarding the effects of these drugs on MP. A diminution of PMP has been reported with clopidogrel and a reduction of EMP levels with statins [15,28]. There were also more smokers in group III but Casey et al. reported that there was no difference in the number of PMP between smokers and non smokers [29].

We found a significant association between EMP and non-calcified coronary diseased segments. This association remained

**Table 3**  
Non-conventional markers according to groups

	Group I (n = 31)	Group II (n = 16)	Group III (n = 9)	p <sup>a</sup>
hsCRP (mg/l)	1.5 [0.5–4.7]	4.7 [1.1–6.4]	9.29 [7.07–11.87]	0.001 (14.2)
Carotid IMT (mm)	0.79 ± 0.13	0.86 ± 0.13	0.93 ± 0.15	0.03 (6.95)
Number of coronary diseased segments per patient				
Total	3.62 ± 3.7	3.30 ± 3.4	5.15 ± 4.1	0.49
Noncalcified	0.21 ± 0.3	0.42 ± 0.5	0.71 ± 0.70	0.048
Mixed	0.69 ± 0.9	0.71 ± 1.3	0.61 ± 0.7	0.84
Calcified	2.80 ± 3.2	2.21 ± 2.8	4.2 ± 4.6	0.67
Calcium score (HU)	96 [0–484]	54 [0–777]	1378 [250–2465]	0.045 (6.2)
PMP CD41+ (counts × 10 <sup>3</sup> /ml)	151.19 [82.7–260.6]	183.90 [155.6–213.5]	219.49 [164.8–241.7]	0.33 (2.22)
EMP CD144+ (counts × 10 <sup>3</sup> /ml)	139.07 [81.6–271.5]	251.80 [121.2–499.3]	442.27 [154.2–826.9]	0.04 (6.36)

For continuous variables results are expressed as median and interquartiles range, except for carotid IMT and number of diseased segments (mean ± S.D.). Controls: EMP CD144+: 95.2 [51.1–131.5] ( $p = 0.02$ ) and PMP CD41+: 64.6 [42.7–106.1] ( $p = 0.04$ ) vs. group I (Mann–Whitney test). For MDCT data the number of patients per group was  $n = 27$ ,  $n = 14$ , and  $n = 8$  in groups I, II and III, respectively.

<sup>a</sup> Value of  $\chi^2$  for Kruskal–Wallis test are given in parenthesis.



borderline significant after adjusting cardiovascular risk level. Furthermore, EMP was correlated with hsCRP which has been shown, in a recent post mortem study, to correlate with the number of vulnerable plaques with thin cap [30]. However, the association that we observed between EMP and noncalcified diseased segments is at least partly independent of hsCRP since we do not observed a significant association between hsCRP and noncalcified diseased segments. Interestingly, there was no relation between EMP and calcified diseased segments supposed to correspond to a more chronic process of atheroma. Our findings are in agreement with those of Bernal-Mizrachi et al. who reported an association between the type of coronary lesions assessed by conventional angiography and EMP mostly in the case of irregular and eccentric high risk lesions [22].

By contrast, PMP were not increased in our patients with ACS, and were not related with noncalcified atheroma. Studies evaluating the relation of MP with cardiovascular disease in the general population have more often found an association between CAD and EMP than PMP [15]. However, we cannot exclude that aggressive treatments of type 2 diabetic patients with ACS, especially the loading dose of clopidogrel, are more likely to diminish PMP than EMP. Another explanation could be that PMP are trapped in the thrombus in the ACS group [15].

Lipid core size and minimal cap thickness are the main determinants of plaque vulnerability and are not related to the plaque size or degree of stenosis. Therefore, angiographic studies showed that only 14% of myocardial infarction could be attributable to severe stenotic lesion [31]. Raggi et al. have found that diabetic patients, for a given rate of events similar as in non-diabetic subjects, had a lower calcium scoring; this report reinforces the interest of tracking vulnerable plaques [32]. In our population of type 2 diabetic patients, we observed one or more noncalcified diseased segments in 57% of patients with ACS versus only 15.4% of asymptomatic patients without metabolic syndrome.

Our study presents some limits. It is difficult to differentiate between lipid-rich and fibrous plaques only on the basis of plaque attenuation evaluated by MDCT. Further studies are needed to validate CT modalities to assess coronary plaque composition. Additionally, prospective studies are needed to evaluate the predictive value of noncalcified atheroma for hard coronary events in type 2 diabetic patients. Recently, Pundziute et al. reported that the number of segments with noncalcified plaques detected by MDCT was an independent predictor of coronary events in non-diabetic patients at high risk of CAD [14].

This is the first study to show an association between EMP and noncalcified potentially vulnerable plaques. Further studies with a prospective design are needed to prove that EMP are related to the occurrence of hard CHD events and subsequently to validate a prevention strategy including this new marker.

## Acknowledgments

We thank Véronique Ficagna, Karine Ferrante and the nurses of our department for their assistance. We are very grateful to Dr. Aude Brac de la Perrière, Sonia Beltran and Gérald Raverot who contributed to the inclusion of patients.

This work was supported by HCL (Hospices Civils de Lyon) and CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). We are also grateful for the support of Astra Zeneca Laboratory.

## References

- [1] Howard BV, Rodriguez BL, Bennett PH, et al. Prevention Conference VI: diabetes and cardiovascular disease: Writing Group I: epidemiology. *Circulation* 2002;105:e132–7.
- [2] Saydah SH, Eberhardt MS, Loria CM, Brancati FL. Age and the burden of death attributable to diabetes in the United States. *Am J Epidemiol* 2002;156:714–9.
- [3] Melchior T, Kober L, Madsen CR, et al. Accelerating impact of diabetes mellitus on mortality in the years following an acute myocardial infarction. TRACE Study Group. Trandolapril Cardiac Evaluation. *Eur Heart J* 1999;20:973–8.
- [4] Milan study on atherosclerosis and diabetes (MiSAD) group: prevalence of unrecognized silent myocardial ischemia and its association with atherosclerotic risks factors in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1997;79:134–9.
- [5] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97.
- [6] Bernard S, Sérusclat A, Targe F, et al. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabet Care* 2005;28:1158–62.
- [7] Raggi P, Shaw LJ, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of coronary artery calcium screening in subjects with and without diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1663–9.
- [8] Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1860–70.
- [9] Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, et al. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American heart association committee on cardiovascular imaging and intervention, council on cardiovascular radiology and intervention, and committee on cardiac imaging, council on clinical cardiology. *Circulation* 2006;114:1761–91.
- [10] Raff GL, Goldstein JA. Coronary angiography by computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1830–3.
- [11] Goldstein JA, Gallagher MJ, O'Neill WW. A randomized controlled trial of multislice coronary computed tomography for evaluation of acute chest pain. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:863–71.
- [12] Achenbach S, Moselewski F, Ropers D, et al. Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography: a segment-based comparison with intravascular ultrasound. *Circulation* 2004;109:14–7.
- [13] Motoyama S, Kondo T, Sarai M, et al. Multi-slice computed tomographic characteristics of coronary lesions in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:319–26.
- [14] Pundziute G, Schuijff JD, Jukema JW, et al. Prognostic value of multislice computed tomography coronary angiography in Patients with known or suspected coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:62–70.
- [15] Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006;48:180–6.
- [16] Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21:157–71.
- [17] Hortman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 2004;9:1118–35.
- [18] Sabatier F, Darmon P, Higel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2006;51:2840–5.
- [19] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Fukushima H, Watanabe K, Sakamoto T. Elevated levels of remnant lipoproteins are associated with plasma platelet microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus without obstructive coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006;27:817–23.
- [20] Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3381–8.
- [21] Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/Annexin V+ Apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:112–6.
- [22] Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2004;97:439–46.
- [23] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841–3.
- [24] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-Cadherin-Positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1622–30.
- [25] Myocardial infarction redefined—A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2000;21:1502–13.
- [26] Touboul PJ, Prati P, Scarabin PY, Adrai V, Thibout E, Ducimetière P. Use of monitoring software to improve the measurement of carotid wall thickness by B-mode imaging. *J Hypertens* 1992;10(Suppl 5):S37–41.
- [27] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the ad hoc committee for grading

- of coronary artery disease, council on cardiovascular surgery, American Heart Association. *Circulation* 1975;51:5–40.
- [28] Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia MV, El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:34–8.
- [29] Casey RG, Joyce M, Roche-Nagle G, Cox D, Bouchier-Hayes DJ. Young male smokers have altered platelets and endothelium that precedes atherosclerosis. *J Surg Res* 2004;116:227–33.
- [30] Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation* 2002;105:2019–23.
- [31] Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657–71.
- [32] Raggi P, Coil B, Ratti C, Callister TQ, Budoff M. Progression of coronary artery calcium and occurrence of myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Hypertension* 2005;46:238–43.

## ANNEXE E

### Publication n°5

**Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P,  
Krausé D, Cercueil JP.**

**Quantification of Liver Fat Content: Comparison of Triple-Echo Chemical  
Shift Gradient-Echo Imaging and in Vivo Proton MR Spectroscopy.**

***Radiology* 2009; 250: 95-102.**

# Quantification of Liver Fat

## Content: Comparison of Triple-Echo Chemical Shift Gradient-Echo Imaging and in Vivo Proton MR Spectroscopy<sup>1</sup>

Boris Guiu, MD  
Jean-Michel Petit, MD  
Romaric Loffroy, MD  
Douraid Ben Salem, MD  
Serge Aho, MD  
David Masson, PhD  
Patrick Hillon, MD, PhD  
Denis Krause, MD, PhD  
Jean-Pierre Cercueil, MD

### Purpose:

To validate a triple-echo gradient-echo sequence for measuring the fat content of the liver, by using hydrogen 1 (<sup>1</sup>H) magnetic resonance (MR) spectroscopy as the reference standard.

### Materials and Methods:

This prospective study was approved by the appropriate ethics committee, and written informed consent was obtained from all patients. In 37 patients with type 2 diabetes (31 men, six women; mean age, 56 years), 3.0-T single-voxel point-resolved <sup>1</sup>H MR spectroscopy of the liver (Couinaud segment VII) was performed to calculate the liver fat fraction from the water (4.7 ppm) and methylene (1.3 ppm) peaks, corrected for T1 and T2 decay. Liver fat fraction was also computed from triple-echo (consecutive in-phase, opposed-phase, and in-phase echo times) breath-hold spoiled gradient-echo sequence (flip angle, 20°), by estimating T2\* and relative signal intensity loss between in- and opposed-phase values, corrected for T2\* decay. Pearson correlation coefficient, Bland-Altman 95% limit of agreement, and Lin concordance coefficient were calculated.

### Results:

Mean fat fractions calculated from the triple-echo sequence and <sup>1</sup>H MR spectroscopy were 10% (range, 0.7%–35.6%) and 9.7% (range, 0.2%–34.1%), respectively. Mean T2\* time was 14.7 msec (range, 5.4–25.4 msec). Pearson correlation coefficient was 0.989 (*P* < .0001) and Lin concordance coefficient was 0.988 (*P* < .0001). With the Bland-Altman method, all data points were within the limits of agreement.

### Conclusion:

A breath-hold triple-echo gradient-echo sequence with a low flip angle and correction for T2\* decay is accurate for quantifying fat in segment VII of the liver. Given its excellent correlation and concordance with <sup>1</sup>H MR spectroscopy, this triple-echo sequence could replace <sup>1</sup>H MR spectroscopy in longitudinal studies.

© RSNA, 2009

<sup>1</sup> From the Departments of Radiology (B.G., R.L., D.K., J.P.C.), Clinical Research (B.G.), Endocrinology (J.M.P.), Neuroradiology (D.B.S.), Epidemiology (S.A.), and Hepatology (P.H.), Le Bocage University Hospital, Bd Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon, France; and Institut National de la Santé et de la Recherche U866 Unit, School of Medicine, Dijon, France (J.M.P., D.M.). Received February 1, 2008; revision requested April 2; revision received May 1; accepted June 6; final version accepted June 25. Supported by a grant from the publicly funded organization Direction de la Recherche Clinique at the Dijon University Hospital, Dijon, France. **Address correspondence** to B.G. (e-mail: [Boris.guiu@chu-dijon.fr](mailto:Boris.guiu@chu-dijon.fr)).

The past decade has witnessed an epidemic increase in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which may affect 10%–30% of adults in the general population (1–3) and 13% of children (4). NAFLD encompasses a broad spectrum of abnormalities, of which the mildest is simple steatosis, which accounts for 80%–90% of cases. However, patients with NAFLD should be monitored for progression to nonalcoholic steatohepatitis, which causes increased morbidity and mortality (2), usually related to cardiovascular or hepatic disorders (5). Cirrhosis develops in 20%–25% of patients with nonalcoholic steatohepatitis (6), who are then at increased risk for hepatocellular carcinoma (7). Early treatment may prevent these adverse outcomes. In addition, liver fat content is important to consider in living donors, as a fat content of 30% or more contraindicates liver donation (8–10). Furthermore, NAFLD may reflect the toxicity of drugs such as amiodarone, tamoxifen, and antiretrovirals (11).

### Advances in Knowledge

- Liver fat content measured from the relative signal intensity loss at chemical shift gradient-echo imaging and corrected for T1 and T2\* decay showed close correlation (Pearson coefficient,  $r = 0.989$ ;  $P < .0001$ ) and strong concordance with the results of  $^1\text{H}$  MR spectroscopy.
- T2\* relaxation time of the liver exhibited considerable interindividual variability (range, 5.4–25.4 msec; standard deviation [SD], 5.5 msec) in patients with type 2 diabetes.
- Since T2 relaxation times of methylene (range, 33.0–77.0 msec; SD, 12.5 msec) and water (range, 12.4–41.2 msec; SD, 5.7 msec) varied widely, liver fat content measured by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy should be corrected for T2 decay by using an individually computed, rather than a theoretic value of T2.

Thus, liver fat quantification has generated considerable interest. Until recently, liver biopsy was the only method for fat content estimation (12). However, this invasive procedure can cause infection, bleeding, or bile leakage (12); in addition, since fat distribution may be heterogeneous, this method is subject to sampling error. Noninvasive methods for quantification of steatosis have been developed by using computed tomography (CT) (13,14) or magnetic resonance (MR) imaging (8,15–17). More recently, in vivo proton MR spectroscopy (hydrogen 1 [ $^1\text{H}$ ] MR spectroscopy) was proved safe and accurate and was used as the reference standard in a number of clinical studies (2,12,18–34). However, although noninvasive,  $^1\text{H}$  MR spectroscopy is time consuming and of limited availability.

Hussain et al (15) recently developed a simple method for fat quantification that is based on in-phase (IP) and opposed-phase (OP) gradient-echo MR imaging. Two flip angles ( $70^\circ$  and  $20^\circ$ ) are used, both to determine whether water or fat is the dominant constituent (on the basis of the shorter native T1 of fat) and to reduce the T1 relaxation effect by acquiring low-flip-angle ( $20^\circ$ ) T1-weighted images. T2\* is computed from a third dual-echo gradient-echo sequence, to allow T2\* corrections. The method was validated by using a phantom model and biopsy specimens from only two patients (15).

We developed a similar but faster method that was based on a breath-hold triple-echo spoiled gradient-echo sequence (with consecutive first IP [IP<sub>1</sub>], OP, and second IP [IP<sub>2</sub>] echo times [TEs]) and a low flip angle of  $20^\circ$ . This method enables estimation of signal intensity loss between IP and OP, corrected for T1 and T2\* decay.

### Implication for Patient Care

- Noninvasive measurement of fat content in the liver, especially useful in patients with nonalcoholic fatty liver disease, can be obtained accurately by using a breath-hold triple-echo gradient-echo sequence.

The purpose of this study was to validate our triple-echo sequence method for liver fat measurement, by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy as the reference standard.

### Materials and Methods

#### Patients

This prospective single-center study was approved by our ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients.

Between October and December 2007, consecutive patients underwent prospective screening at the Department of Endocrinology, Le Bocage University Hospital, Dijon, France, for the following inclusion criteria: They had type 2 diabetes for at least 2 years, were older than 18 years, and had a body weight of less than 150 kg (the MR imaging table weight limit). Of the 46 patients who met these criteria, two declined to participate in the study. Contraindications to MR imaging were presence of a pacemaker or metallic implant (one patient) and claustrophobia (two patients). Of the 41 remaining pa-

#### Published online

10.1148/radiol.2493080217

Radiology 2009; 250:95–102

#### Abbreviations:

IP = in phase  
 IP<sub>1</sub> = first IP  
 IP<sub>2</sub> = second IP  
 NAFLD = nonalcoholic fatty liver disease  
 OP = opposed phase  
 ROI = region of interest  
 SD = standard deviation  
 SI = signal intensity  
 TE = echo time  
 TR = repetition time

#### Author contributions:

Guarantor of integrity of entire study, J.P.C.; study concepts/study design or data acquisition or data analysis/interpretation, all authors; manuscript drafting or manuscript revision for important intellectual content, all authors; manuscript final version approval, all authors; literature research, all authors; clinical studies, B.G., J.M.P., R.L., D.B.S., D.M., P.H., D.K., J.P.C.; statistical analysis, B.G., J.M.P., S.A., J.P.C.; and manuscript editing, all authors

Authors stated no financial relationship to disclose.

tients, four were excluded because of equipment failure during MR imaging ( $n = 1$ ) or noninterpretable spectra because of breathing ( $n = 3$ ). Pregnancy was an exclusion criterion, but none of the patients who underwent screening for the study were pregnant. Thus, the study was conducted in 37 patients, 31 men (mean age, 57 years; range, 46–83 years) and six women (mean age, 53 years; range, 45–77 years), with a mean age of 56 years (range, 45–83 years). Two of 37 patients had a known history of hepatic hemosiderosis.

### MR Imaging

MR imaging and MR spectroscopy were performed during the same examination by using a 3.0-T unit (Magnetom Trio Tim; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany), with a peak gradient amplitude of 45 mT/m and a time to peak of 204  $\mu$ sec. A six-element body phased-array coil system was used.

All patients were supine and were carefully instructed to suspend respiration at end inspiration and to be consistent in their breath holds. To allow correct positioning, localizing sequences in the coronal, transverse, and sagittal planes were performed during a breath hold. The second sequence, performed through the liver, was a transverse breath-hold low-flip-angle T1-weighted two-dimensional triple-echo spoiled gradient-echo sequence with the following parameters: repetition time (TR) msec/TE msec, 192/2.46 [IP<sub>1</sub>], 3.69 [OP], 4.92 [IP<sub>2</sub>]; flip angle, 20°; section thickness, 6 mm; intersection gap, 1.2 mm; matrix, 256  $\times$  192; number of sections, 25; and acquisition time, 34 seconds. Parallel imaging (with an acceleration factor of two) was performed by using generalized autocalibrating partially parallel acquisition (GRAPPA; Siemens Medical Solutions). The full volume of the liver was imaged by using two separate breath holds (each lasting 17 seconds), because of breath-hold limitations.

### <sup>1</sup>H MR Spectroscopy

Single-voxel MR spectroscopic data were acquired by using seven breath-hold point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequences, with param-

eters of 1500/30, 40, 50, 60, 80, 100, and 135; eight acquisitions; and 2048 data points over a 1250-Hz spectral width to measure T2 relaxation times of water and methylene. The same 20  $\times$  20  $\times$  20-mm (8-mL) voxel was used for these seven sequences and was positioned by a radiologist (J.P.C., with 15 years of experience with liver imaging) obliquely on Couinaud segment VII on the transverse low-flip-angle T1-weighted section, with care to avoid extrahepatic fat, large hepatic vessels, and organs adjacent to the liver.

Finally, to minimize T1 effects, we acquired a free-breathing point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequence (4000/30; 32 acquisitions; 2048 data points over 1250-Hz spectral width; and 4-minute acquisition time). The correct position of the 20  $\times$  20  $\times$  20-mm (8-mL) voxel was then determined from three localizing sequences: at maximum inspiration, at maximum expiration, and during free breathing. In this way, we determined the range of positioning, from highest to lowest, where segment VII could be located during the free-breathing acquisition.

For each of the two voxel placements, automated optimization of gradient shimming, followed by manual adjustment of central frequency, was performed, and water line widths of 40–50 Hz were obtained. Water suppression was not performed for any sequence.

### <sup>1</sup>H MR Spectroscopic Data Analysis

<sup>1</sup>H MR spectroscopic data were interpreted by a radiologist (J.P.C.), who was blinded to MR imaging results. The Java-based MR user interface spectroscopic analysis package (jMRUI; A. van den Boogaart, Catholic University, Leuven, Belgium) was used for time-domain analysis (35). Metabolite signals were analyzed by using the Advanced Magnetic Resonance, or AMARES, fitting algorithm within jMRUI (36), which enables the inclusion of a large amount of prior knowledge. We measured the water peak at 4.7 ppm and the methylene peak at 1.3 ppm. Spectra were used only if homogeneity after shimming was better than 0.45 ppm, measured as the

full width at 50% peak height. Peak integrals were quantified by fitting to a Gaussian line shape.

T2 relaxation times of both metabolites were determined from their peak amplitudes at each TE by using an exponential least-squares fitting algorithm (Fig 1). No data point was discarded to perform these calculations. The peak areas of the methylene and water signals obtained from the spectroscopic sequence with a TR of 4000 msec (used to limit T1 effects) (Fig 1) were also corrected for T2 effects (ie, theoretic peak areas with 0 TE [ $A_0$ ]), by using the means of previously calculated T2 relaxation times, as follows:  $A_0 = A_{30}/e^{(-30/T_2)}$ , where  $A_{30}$  was the peak metabolite area on the spectroscopic sequence obtained with 4000/30 and T2 was the T2 (in milliseconds) of the metabolite.

Liver fat content (as a percentage) with MR spectroscopy,  $F_{MRS}$ , was calculated as follows:  $F_{MRS} = 100 \cdot A_{0-CH_2}/(A_{0-CH_2} + A_{0-H_2O})$ , where  $A_{0-CH_2}$  and  $A_{0-H_2O}$  are the areas of the methylene and water peaks, respectively, corrected for both T1 and T2 effects.

### Image Interpretation

MR imaging results were interpreted by a radiologist (B.G., with 4 years of experience with liver imaging) who was blinded to <sup>1</sup>H MR spectroscopic findings. An ROI that was 1–2 cm in diameter was drawn in segment VII, at the same site as the voxel used for <sup>1</sup>H MR spectroscopy. The signal intensity (SI) in the ROI was recorded for IP<sub>1</sub> (TE, 2.46 msec), IP<sub>2</sub> (TE, 4.92 msec), and OP (TE, 3.69 msec) low-flip-angle T1-weighted MR images. We used the copy-and-paste function of the workstation (Leonardo; Siemens Medical Solutions) to draw exactly the same ROIs at the same locations on IP and OP images (Fig 1). The standard deviation (SD) of SI measured in each ROI was kept under 10%, by slightly moving the ROI or modifying its diameter, if necessary.

The IP SI corrected for T2\* decay ( $SI_{IP-C}$ ) was computed as  $SI_{IP} \cdot e^{(-\Delta TE/T_2^*)}$  (15), where  $SI_{IP}$  was the IP<sub>1</sub> SI and  $\Delta TE$  was the TE difference between IP and OP states (ie,  $\Delta TE = 1.23$  msec at 3.0 T). Thus, fat content with the triple-

echo sequence,  $F_{\text{trip}}$  (as a percentage), in each ROI was computed as follows:  $F_{\text{trip}} = 100 \cdot (SI_{\text{IP-C}} - SI_{\text{OP}}) / (2 \cdot SI_{\text{IP-C}})$ , where  $SI_{\text{OP}}$  was OP SI.

### Statistical Analysis

Agreement between the fat content with the triple-echo sequence and that with MR spectroscopy was assessed in three steps. First, we drew a scatterplot and performed linear regression to assess the relationship between the fat content with the triple-echo sequence and that with MR spectroscopy. The Pearson correlation coefficient was also calculated. Second, we estimated agreement by using the 95% limit-of-agreement method developed by Bland and Altman (37), in which

the difference between the fat content with the triple-echo sequence and that with MR spectroscopy is plotted against their means, with the 95% confidence intervals. A rough indication of systematic bias and random error is provided by examining the direction and magnitude, respectively, of the scatter around the zero line. Heteroscedasticity also can be detected; it manifests as dependency of the difference on the magnitude of the mean. Third, we computed the Lin concordance coefficient correlation  $\rho_c$  (38). The Lin coefficient combines measures of precision and accuracy to determine whether the observed data deviate significantly from the line of perfect concordance (ie, the 45° line).

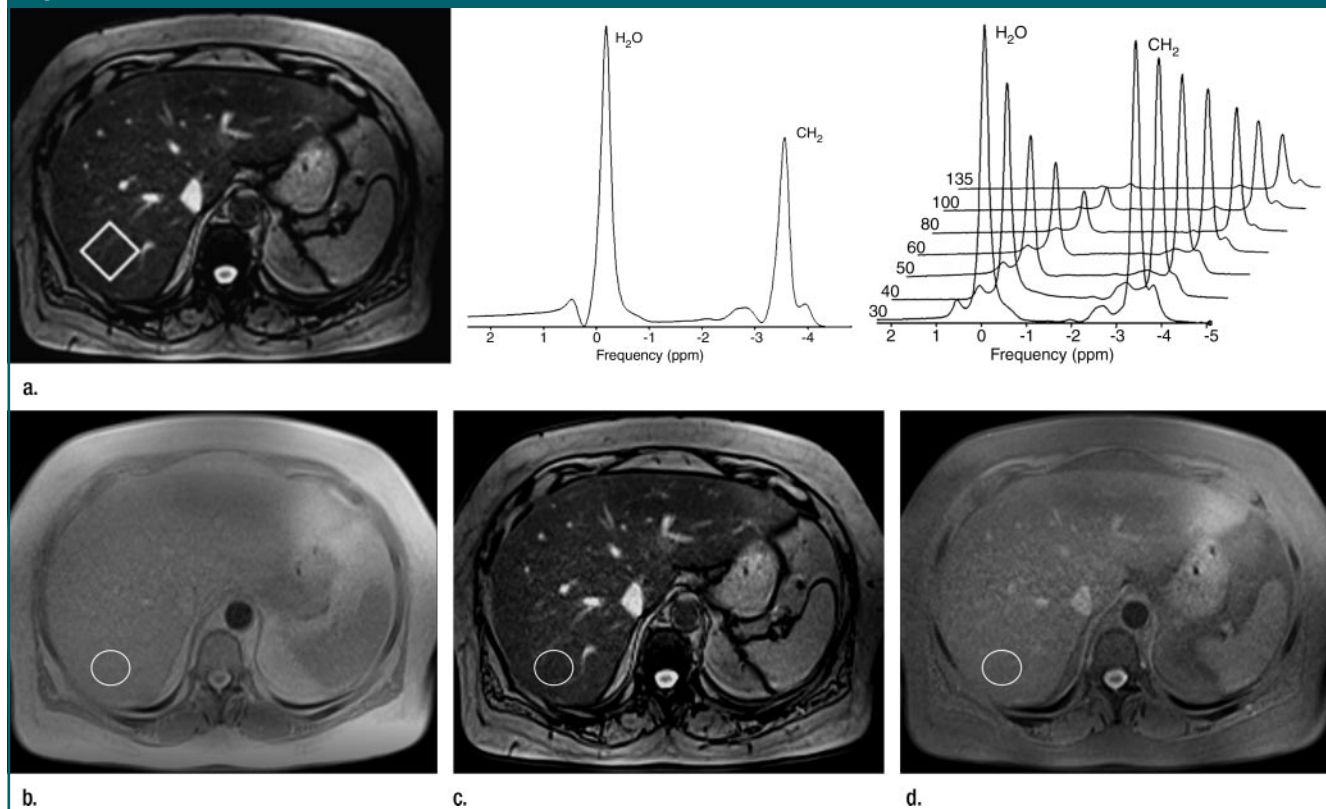
The Lin coefficient was considered complementary to the 95% limit of agreement.

All statistical analyses were performed by using software (Stata, version 10.0; Stata, College Station, Tex).  $P$  values  $< .05$  were considered to indicate a significant difference.

### Results

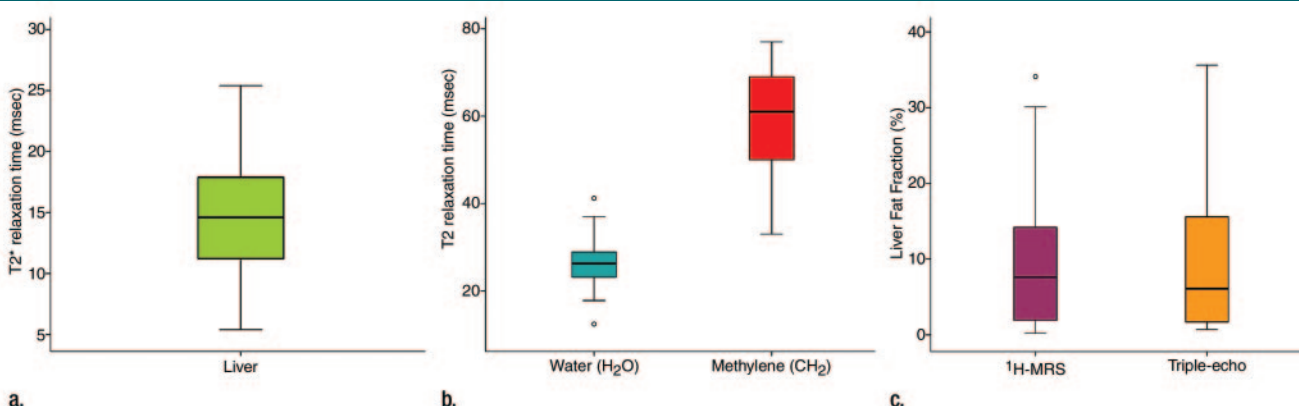
Descriptive data on calculated  $T2^*$  times, calculated  $T2$  times of water and methylene, and liver fat fractions measured by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy and the triple-echo sequence are illustrated in Figure 2. Mean fat percentage with the triple-echo sequence was 10.0% (SD, 9.5%; range, 0.7%–35.6%). Mean

Figure 1



**Figure 1:**  $^1\text{H}$  MR spectra and MR images in 56-year-old woman with type 2 diabetes and severe steatosis. (a) Left: Transverse low-flip-angle T1-weighted MR image (192/3.69). Square shows position of voxel in segment VII of liver. Middle:  $^1\text{H}$  MR spectra obtained from free-breathing point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequence (4000/30; 32 acquisitions; 8-mL voxel size), performed with long TR to limit T1 effects. Right:  $^1\text{H}$  MR spectra obtained by using seven breath-hold point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequences (1500/30, 40, 50, 60, 80, 100, 135; eight acquisitions; 8-mL voxel size) to calculate  $T2$  relaxation times of water and methylene peaks. (b–d) MR images obtained from breath-hold intermediate-weighted triple-echo spoiled gradient-echo sequence (192/2.46 [IP<sub>1</sub>], 3.69 [OP], 4.92 [IP<sub>2</sub>]; flip angle, 20°). Region of interest (ROI) was placed in segment VII of liver. (b) IP<sub>1</sub> and (d) IP<sub>2</sub> images were used to calculate  $T2^*$  relaxation time of liver. (b) IP<sub>1</sub> and (c) OP images were used to calculate relative signal intensity loss caused by liver fat, corrected for  $T2^*$  decay. Low flip angle of 20° considerably reduced T1 effects.

Figure 2



**Figure 2:** Box plots of (a)  $T_2^*$  relaxation times of liver calculated from triple-echo gradient-echo sequence, (b)  $T_2$  times of water and methylene determined from their peak amplitudes ( $^1\text{H}$  MR spectroscopy) at each TE by using exponential least-squares fitting algorithm, and (c) liver fat fraction calculated by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy and triple-echo sequence in segment VII of liver in 37 patients with type 2 diabetes. Horizontal line in each box is the median. Lower and upper ends of each box are limits of first and third quartiles, and height of each box is interquartile range. Vertical lines extending above and below each box end on data points farthest from mean but within distance of 1.5 times interquartile range from end of each box. Data points that are outliers ( $\circ$ ) are located between 1.5 and three times the interquartile range from end of each box.

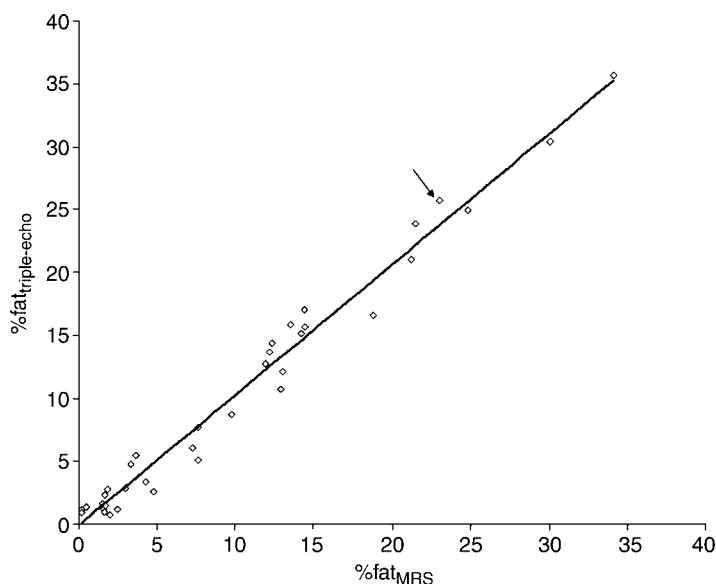
$T_2^*$  time was 14.7 msec (SD, 5.5 msec; range, 5.4–25.4 msec). Mean fat percentage with  $^1\text{H}$  MR spectroscopy was 9.7% (SD, 9.0%; range, 0.2%–34.1%). Mean  $T_2$  times of water and methylene were 26.3 msec (SD, 5.7 msec; range, 12.4–41.2 msec) and 59.1 msec (SD, 12.5 msec; range, 33.0–77.0 msec), respectively.

Figure 3 shows the scatterplot between the fat content with MR spectroscopy and that with the triple-echo sequence, with linear regression. The Pearson correlation coefficient was 0.989 ( $P < .0001$ ). Figure 4 shows the Bland-Altman plot, where all points are within the 95% limit of agreement. Finally, the Lin concordance coefficient was 0.988 ( $P < .0001$ ).

### Discussion

Ultrasonography and computed tomography (CT) can depict fatty liver infiltration but are not routinely used to provide quantification of hepatic steatosis, although methods have been developed with CT (13,14). Indeed, repeated CT scanning is associated with substantial radiation exposure and, therefore, is inappropriate in longitudinal studies (12). Multiple MR approaches have been proposed: two- or three-point Dixon techniques (39); fat-saturated imaging (16); spectral fat-selective imaging (30); IP and OP imaging (15);  $^1\text{H}$  MR spectroscopy (19); and iterative decomposition

Figure 3



**Figure 3:** Scatterplot and regression line show close correlation between liver fat content calculated with  $^1\text{H}$  MR spectroscopy ( $\%fat_{MRS}$ ) and that calculated with triple-echo gradient-echo sequence ( $\%fat_{\text{triple-echo}}$ ) (Pearson correlation coefficient,  $r = 0.989$ ;  $P < .0001$ ). Lin concordance coefficient was 0.988 ( $P < .0001$ ). Liver fat fraction measured by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy and triple-echo sequence was 23.1% and 25.7%, respectively (arrow), in 56-year-old woman with type 2 diabetes in Figure 1.

of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation, also called IDEAL, imaging (40). This last technique requires an imaging time at least

of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation, also called IDEAL, imaging (40). This last technique requires an imaging time at least



three times longer than conventional imaging but has recently shown promising accuracy (39) and overcomes the problem of fat-water ambiguity that is common to all chemical shift methods. Although the time-consuming nature and limited availability of  $^1\text{H}$  MR spectroscopy are obstacles to widespread use in clinical practice, this technique is now regarded as the most accurate non-invasive method (41), most notably with a 3.0-T system, given its improved signal-to-noise ratio and greater spectral resolution.

Our triple-echo method is derived, in part, from the method described by Hussain et al (15), which involves three dual-echo breath-hold gradient-echo sequences. Because T1 relaxation times of normal liver and fat differ substantially (810 and 380 msec, respectively, at 3.0 T) (42), Hussain et al used a low-flip-angle T1-weighted gradient-echo sequence with a  $20^\circ$  flip angle to greatly reduce the T1 relaxation effect by minimizing T1 weighting. They also acquired a second dual-echo gradient-echo sequence, this time with a large flip angle of  $70^\circ$ , to determine which constituent was dominant by comparing the fat percentages calculated with the two flip angles. Finally, a third dual-echo gradient-echo sequence was performed to deter-

mine the  $T2^*$  time of each ROI, thereby enabling the corrections required by  $T2^*$  decay.

Here, we report a similar method involving a single triple-echo ( $\text{IP}_1$ , OP, and  $\text{IP}_2$  consecutively) gradient-echo sequence with a  $20^\circ$  flip angle. The first and third echoes ( $\text{IP}_1$  and  $\text{IP}_2$ ) were used to calculate  $T2^*$  relaxation. From  $\text{IP}_1$  and OP, we estimated the SI loss caused by fat content, corrected for T1 and  $T2^*$  decay. To our knowledge, a greater amount of fat (methylene) than water in livers with steatosis has been reported in only one patient in a study published in 2005 (12). We assumed that water was always the dominant constituent in fatty liver, an idea that is supported by several case-series studies of liver fat quantification by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy, including the largest one (2349 patients) in which the highest fat percentage was 47.5% (23), as well as more recent reports (43–45). Irwan et al (46) recently reported that the method developed by Hussain et al (15) produced an incorrect fat percentage of 89.3%, compared with 5.1%, by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy in one of their 10 volunteers, because the dominant constituent was mistakenly recognized as fat instead of water. In fact, the SD of the signal intensity on IP and OP images

often may be larger than the relative signal intensity loss when fat content is low (46). Consequently, we believe that the gradient-echo sequence with a  $70^\circ$  flip angle suggested by Hussain et al (15) is probably unnecessary, as confirmed by the excellent correlations obtained in our study, even when fat content was low.

We evaluated type 2 diabetic patients, because NAFLD is extremely common in this population, with a prevalence of 69.5% in a recent study (47). Furthermore, the fat percentage varies widely in this population, from 0.2% to 35.6% in our study, a useful feature when assessing a fat content measurement tool.

With  $^1\text{H}$  MR spectroscopy, peak area is proportional to concentration of the metabolite containing the relevant nuclei but is also influenced by T1 and T2 relaxation times (35). Consequently, SI values of each resonance must be corrected for T1 and T2 relaxation times. T2 relaxation times of water and methylene were calculated by using a least-squares algorithm. Interestingly, T2 of water (range, 12.4–41.2 msec; SD, 5.7 msec) and methylene (range, 33.0–77.0 msec; SD, 12.5 msec) varied considerably. This considerable interindividual variability may lead to erroneous results when theoretic T2 relaxation times are used (24). For instance, a fat (methylene) T2 of 33 msec instead of 77 msec in one of our patients would have yielded a fat content with MR spectroscopy of 42.0% instead of 30.1%.

For our  $^1\text{H}$  MR spectroscopy estimates of liver fat, we used a sequence with a long TR (4 seconds), because T1 relaxation values of water and fat can be considered negligible when TR is five times T1 or greater. Despite the use of a 3.0-T MR system, this sequence could not be performed within a breath hold, because of the long TR and the need for 32 acquisitions to achieve an adequate signal-to-noise ratio. Movements sometimes affected the MR signal, for instance increasing line width, reducing peak intensities, or doubling all peaks (35), especially when breathing was irregular. Movements prevented spectrum interpretation in three of our pa-

Figure 4

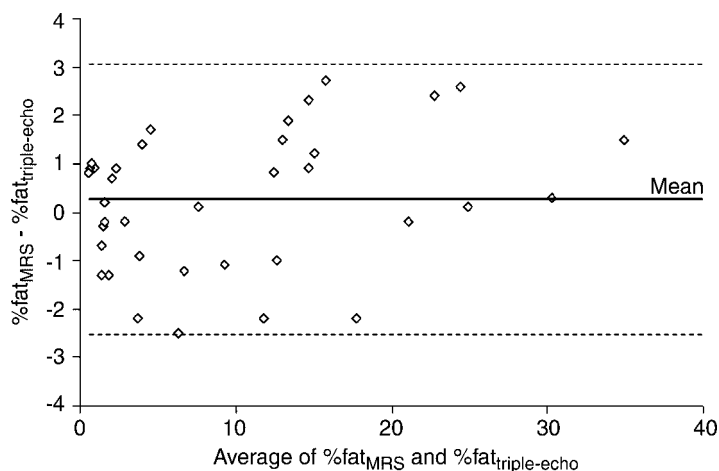


Figure 4: Differences between liver fat fraction estimated by using  $^1\text{H}$  MR spectroscopy and triple-echo sequence were plotted against means, with 95% confidence intervals (Bland-Altman plot). All data points were within limits of agreement (dotted lines), corresponding to  $\pm 1.96$  SDs from mean. Keys are same as on Figure 3.

tients. For the same reason, multivoxel spectroscopy may provide noninterpretable spectra, particularly as some of the liver voxels can be contaminated by surrounding tissues during the long acquisition time (20 minutes) (46).

T2\* relaxation time shows considerable interindividual variability: Thus, values in our study ranged from 5.4 to 25.4 msec. The two shortest T2\* relaxation times were in patients with hepatic hemosiderosis. Liver iron overload is a common complication of many chronic liver diseases (17), including hepatitis C, NAFLD, cirrhosis (48,49), and hemochromatosis. In patients with liver iron overload, the fat content computed from IP and OP images is erroneous unless a correction is made for the influence of T2\* decay (17,50). In a comparison of fat quantification with IP and OP gradient-echo MR imaging and fat-saturated fast spin-echo MR imaging in 27 patients (including 16 with cirrhosis), by using histologic findings as the reference standard, the correlation coefficient was better with the fat-saturated technique ( $r = 0.92$  vs  $0.69$ ,  $P < .01$ ); however, no T2\* correction was used with the IP and OP gradient-echo method (16).

In a study in which the method developed by Hussain et al (15) versus  $^1\text{H}$  MR spectroscopy as the reference standard was assessed in 10 healthy volunteers, liver fat content was systematically overestimated by 4% in patients with low fat content (range, 1%–10%), suggesting inadequate T2\* correction (46). The absence of such overestimation in our study is probably ascribable to the use of a spoiled gradient-echo sequence with two closely spaced IP echoes, at 2.46 and 4.92 msec, compared with 4.5 and 18 msec at 1.5 T, which were also the values used by Hussain et al (15). Because T2\* relaxation of fat is a complex function, T2\* estimates in fatty livers are more accurate when they are based on IP echoes close to those used for IP and OP imaging, which is confirmed by the fact that the linear fit line crosses the y-axis near the 0% point (0.1%), instead of the 4.5% point in the study reported by Irwan et al (46).

According to the Bland-Altman analysis, the liver fat fraction calculated by using the triple-echo method can be expected to be within 2% or 3% of the  $^1\text{H}$  MR spectroscopy value over the 0.7%–35.6% range. Interestingly, this value is smaller than the mean coefficient of variation of  $^1\text{H}$  MR spectroscopy, usually reported at approximately 8% (12,23).

Our triple-echo sequence has several advantages over  $^1\text{H}$  MR spectroscopy, in addition to the high coefficients of correlation ( $r = 0.989$ ,  $P < .0001$ ) and concordance ( $r = 0.988$ ,  $P < .0001$ ). First, the acquisition time is very short, fitting easily within a breath hold. Second, fat content can be measured throughout the liver instead of in only one or a few voxels. This point is of major importance, as fat distribution often is heterogeneous. Third, no spatial misregistration errors occur, as the OP and two IP images are acquired simultaneously by using triple echoes. Fourth, postprocessing is considerably easier and faster than with  $^1\text{H}$  MR spectroscopy.

The limitations of our study must be acknowledged. First, the number of patients was fairly small. Second, our method was compared with another indirect method,  $^1\text{H}$  MR spectroscopy, not to histologic findings. However, performing liver biopsies for research purposes in patients who are free of known liver disease raises ethical problems. Moreover, the amount of fat in the biopsy specimen might not be representative of the amount of fat throughout the liver (15,51). In addition, the percentage of fat estimated by using histologic analysis may vary considerably, depending on the method used by the pathologist (52,53). Third, we assumed that the water signal was consistently stronger than the lipid (methylene) signal, which obviated the need to correct for the theoretic ambiguity in regard to which constituent was dominant. As previously mentioned, results of the largest published studies on hepatic steatosis support this assumption. Nevertheless, high-fat liver lesions (eg, lipoma) must be identified to ensure that the fat percentage will not be underesti-

mated. Fourth, all the data were obtained from segment VII for technical reasons involving the signal-to-noise ratio with  $^1\text{H}$  MR spectroscopy. We did not assess the geographic reproducibility of the triple-echo technique by comparing data from various liver segments. Fifth, the lipid fraction measured by using our method and most other MR-based methods represents the signal derived from protons contained in fatty acid molecules, as opposed to the weight of lipids per unit of liver volume.

In conclusion, we developed a fast, accurate, easy-to-perform, noninvasive MR imaging method for measuring liver fat content by using a breath-hold triple-echo gradient-echo sequence. The excellent agreement with  $^1\text{H}$  MR spectroscopy suggests that the triple-echo method may be used for noninvasive liver fat content measurement, most notably in longitudinal studies.

**Acknowledgment:** We are grateful to Alexandre Vignaud for his help.

## References

- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221–1231.
- Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology* 2007;46:582–589.
- Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007;133:496–506.
- Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006;118:1388–1393.
- Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865–873.
- Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001;21:17–26.
- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134–140.
- Kim SH, Lee JM, Han JK, et al. Hepatic macrosteatosis: predicting appropriateness of liver donation by using MR imaging—correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2006;240:116–129.

9. McCormack L, Clavien PA. Understanding the meaning of fat in the liver. *Liver Transpl* 2005; 11:137-139.
10. Cho JY, Suh KS, Kwon CH, et al. The hepatic regeneration power of mild steatotic grafts is not impaired in living-donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:210-217.
11. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;6: 1-28.
12. Thomas EL, Hamilton G, Patel N, et al. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 2005;54:122-127.
13. Ricci C, Longo R, Gioulis E, et al. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 1997;27:108-113.
14. Lee SW, Park SH, Kim KW, et al. Unenhanced CT for assessment of macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: comparison of visual grading with liver attenuation index. *Radiology* 2007;244:479-485.
15. Hussain HK, Chenevert TL, Londy FJ, et al. Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display—early experience. *Radiology* 2005;237:1048-1055.
16. Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV. Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques—initial experience. *Radiology* 2005;237: 507-511.
17. Westphalen AC, Qayyum A, Yeh BM, et al. Liver fat: effect of hepatic iron deposition on evaluation with opposed-phase MR imaging. *Radiology* 2007;242:450-455.
18. Hwang JH, Stein DT, Barzilai N, et al. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1663-E1669.
19. Longo R, Pollesello P, Ricci C, et al. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995;5:281-285.
20. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:797-802.
21. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 3023-3028.
22. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999;276:E977-E989.
23. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288: E462-E468.
24. Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 1994;12:487-495.
25. Tiikkainen M, Tamminen M, Hakkinen AM, et al. Liver-fat accumulation and insulin resistance in obese women with previous gestational diabetes. *Obes Res* 2002;10:859-867.
26. Hadigan C, Liebaw J, Andersen R, Holalkere NS, Sahani DV. Magnetic resonance spectroscopy of hepatic lipid content and associated risk factors in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;46:312-317.
27. Ishii M, Yoshioka Y, Ishida W, et al. Liver fat content measured by magnetic resonance spectroscopy at 3.0 tesla independently correlates with plasminogen activator inhibitor-1 and body mass index in type 2 diabetic subjects. *Tohoku J Exp Med* 2005;206:23-30.
28. Kawamitsu H, Kaji Y, Ohara T, Sugimura K. Feasibility of quantitative intrahepatic lipid imaging applied to the magnetic resonance dual gradient echo sequence. *Magn Reson Med* 2003;2:47-50.
29. Liska D, Dufour S, Zern TL, et al. Interethnic differences in muscle, liver and abdominal fat partitioning in obese adolescents. *PLoS ONE* 2007;2:e569.
30. Machann J, Thamer C, Schoedt B, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized 1H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med* 2006;55:913-917.
31. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37: 1202-1219.
32. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, et al. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care* 2007;30:683-688.
33. Sijens PE, Smit GP, Borgdorff MA, Kappert P, Oudkerk M. Multiple voxel 1H MR spectroscopy of phosphorolase-b kinase deficient patients (GSD IXa) showing an accumulation of fat in the liver that resolves with aging. *J Hepatol* 2006;45:851-855.
34. Tarasow E, Siergiejczyk L, Panasiuk A, et al. MR proton spectroscopy in liver examinations of healthy individuals in vivo. *Med Sci Monit* 2002;8:MT36-MT40.
35. Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME. 1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites. *Radiology* 2006; 240:318-332.
36. Naressi A, Couturier C, Devos JM, et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *MAGMA* 2001;12:141-152.
37. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.
38. Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45: 255-268.
39. Kim H, Taksali SE, Dufour S, et al. Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL. *Magn Reson Med* 2008;59:521-527.
40. Reeder SB, Hargreaves BA, Yu H, Brittain JH. Homodyne reconstruction and IDEAL water-fat decomposition. *Magn Reson Med* 2005;54: 586-593.
41. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, et al. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* 2008;47:1513-1523.
42. de Bazelaire CM, Duhamel GD, Rofsky NM, Alsop DC. MR imaging relaxation times of abdominal and pelvic tissues measured in vivo at 3.0 T: preliminary results. *Radiology* 2004;230:652-659.
43. Browning JD. Statins and hepatic steatosis: perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 2006;44:466-471.
44. Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 2008;134:1369-1375.
45. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:165-169.
46. Irwan R, Edens MA, Sijens PE. Assessment of the variations in fat content in normal liver using a fast MR imaging method in comparison with results obtained by spectroscopic imaging. *Eur Radiol* 2008;18:806-813.
47. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:2119-2121.
48. Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, et al. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 1999;30:847-850.
49. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:759-768.
50. Alustiza JM, Castiella A. Liver fat and iron at in-phase and opposed-phase MR imaging [letter]. *Radiology* 2008;246:641.
51. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128: 1898-1906.
52. Marsman H, Matsushita T, Dierkhising R, et al. Assessment of donor liver steatosis: pathologist or automated software? *Hum Pathol* 2004;35: 430-435.
53. Roullier V, Cavaro-Ménard C, Guillaume C, Aubé C. Fuzzy algorithms to extract vacuoles of steatosis on liver histological color images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007; 2007:5575-5578.

# Radiology 2008

## This is your reprint order form or pro forma invoice

(Please keep a copy of this document for your records.)

Reprint order forms and purchase orders or prepayments must be received 72 hours after receipt of form either by mail or by fax at 410-820-9765. It is the policy of Cadmus Reprints to issue one invoice per order.

**Please print clearly.**

Author Name \_\_\_\_\_  
Title of Article \_\_\_\_\_  
Issue of Journal \_\_\_\_\_ Reprint # \_\_\_\_\_ Publication Date \_\_\_\_\_  
Number of Pages \_\_\_\_\_ KB # \_\_\_\_\_ Symbol Radiology  
Color in Article? Yes / No (Please Circle)

**Please include the journal name and reprint number or manuscript number on your purchase order or other correspondence.**

### Order and Shipping Information

#### Reprint Costs (Please see page 2 of 2 for reprint costs/fees.)

\_\_\_\_\_ Number of reprints ordered \$ \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Number of color reprints ordered \$ \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Number of covers ordered \$ \_\_\_\_\_  
**Subtotal** \$ \_\_\_\_\_  
Taxes \$ \_\_\_\_\_

(Add appropriate sales tax for Virginia, Maryland, Pennsylvania, and the District of Columbia or Canadian GST to the reprints if your order is to be shipped to these locations.)

First address included, add \$32 for  
each additional shipping address \$ \_\_\_\_\_

**TOTAL** \$ \_\_\_\_\_

#### Shipping Address (cannot ship to a P.O. Box) Please Print Clearly

Name \_\_\_\_\_  
Institution \_\_\_\_\_  
Street \_\_\_\_\_  
City \_\_\_\_\_ State \_\_\_\_\_ Zip \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Quantity \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_  
Phone: Day \_\_\_\_\_ Evening \_\_\_\_\_  
E-mail Address \_\_\_\_\_

#### Additional Shipping Address\* (cannot ship to a P.O. Box)

Name \_\_\_\_\_  
Institution \_\_\_\_\_  
Street \_\_\_\_\_  
City \_\_\_\_\_ State \_\_\_\_\_ Zip \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Quantity \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_  
Phone: Day \_\_\_\_\_ Evening \_\_\_\_\_  
E-mail Address \_\_\_\_\_

\* Add \$32 for each additional shipping address

### Payment and Credit Card Details

**Enclosed:** Personal Check \_\_\_\_\_  
Credit Card Payment Details \_\_\_\_\_  
Checks must be paid in U.S. dollars and drawn on a U.S. Bank.  
Credit Card:  VISA  Am. Exp.  MasterCard  
Card Number \_\_\_\_\_  
Expiration Date \_\_\_\_\_  
Signature: \_\_\_\_\_

Please send your order form and prepayment made payable to:

**Cadmus Reprints**  
**P.O. Box 751903**  
**Charlotte, NC 28275-1903**

*Note: Do not send express packages to this location, PO Box.*  
FEIN #:541274108

Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Signature is required. By signing this form, the author agrees to accept the responsibility for the payment of reprints and/or all charges described in this document.

### Invoice or Credit Card Information

#### Invoice Address Please Print Clearly

Please complete Invoice address as it appears on credit card statement

Name \_\_\_\_\_  
Institution \_\_\_\_\_  
Department \_\_\_\_\_  
Street \_\_\_\_\_  
City \_\_\_\_\_ State \_\_\_\_\_ Zip \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Phone \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_  
E-mail Address \_\_\_\_\_

**Cadmus will process credit cards and Cadmus Journal  
Services will appear on the credit card statement.**

*If you don't mail your order form, you may fax it to 410-820-9765 with  
your credit card information.*

# Radiology 2008

## Black and White Reprint Prices

Domestic (USA only)						
# of Pages	50	100	200	300	400	500
1-4	\$221	\$233	\$268	\$285	\$303	\$323
5-8	\$355	\$382	\$432	\$466	\$510	\$544
9-12	\$466	\$513	\$595	\$652	\$714	\$775
13-16	\$576	\$640	\$749	\$830	\$912	\$995
17-20	\$694	\$775	\$906	\$1,017	\$1,117	\$1,220
21-24	\$809	\$906	\$1,071	\$1,200	\$1,321	\$1,471
25-28	\$928	\$1,041	\$1,242	\$1,390	\$1,544	\$1,688
29-32	\$1,042	\$1,178	\$1,403	\$1,568	\$1,751	\$1,924
Covers	\$97	\$118	\$215	\$323	\$442	\$555

## Color Reprint Prices

Domestic (USA only)						
# of Pages	50	100	200	300	400	500
1-4	\$223	\$239	\$352	\$473	\$597	\$719
5-8	\$349	\$401	\$601	\$849	\$1,099	\$1,349
9-12	\$486	\$517	\$852	\$1,232	\$1,609	\$1,992
13-16	\$615	\$651	\$1,105	\$1,609	\$2,117	\$2,624
17-20	\$759	\$787	\$1,357	\$1,997	\$2,626	\$3,260
21-24	\$897	\$924	\$1,611	\$2,376	\$3,135	\$3,905
25-28	\$1,033	\$1,071	\$1,873	\$2,757	\$3,650	\$4,536
29-32	\$1,175	\$1,208	\$2,122	\$3,138	\$4,162	\$5,180
Covers	\$97	\$118	\$215	\$323	\$442	\$555

International (includes Canada and Mexico)						
# of Pages	50	100	200	300	400	500
1-4	\$272	\$283	\$340	\$397	\$446	\$506
5-8	\$428	\$455	\$576	\$675	\$784	\$884
9-12	\$580	\$626	\$805	\$964	\$1,115	\$1,278
13-16	\$724	\$786	\$1,023	\$1,232	\$1,445	\$1,652
17-20	\$878	\$958	\$1,246	\$1,520	\$1,774	\$2,030
21-24	\$1,022	\$1,119	\$1,474	\$1,795	\$2,108	\$2,426
25-28	\$1,176	\$1,291	\$1,700	\$2,070	\$2,450	\$2,813
29-32	\$1,316	\$1,452	\$1,936	\$2,355	\$2,784	\$3,209
Covers	\$156	\$176	\$335	\$525	\$716	\$905

International (includes Canada and Mexico))						
# of Pages	50	100	200	300	400	500
1-4	\$278	\$290	\$424	\$586	\$741	\$904
5-8	\$429	\$472	\$746	\$1,058	\$1,374	\$1,690
9-12	\$604	\$629	\$1,061	\$1,545	\$2,011	\$2,494
13-16	\$766	\$797	\$1,378	\$2,013	\$2,647	\$3,280
17-20	\$945	\$972	\$1,698	\$2,499	\$3,282	\$4,069
21-24	\$1,110	\$1,139	\$2,015	\$2,970	\$3,921	\$4,873
25-28	\$1,290	\$1,321	\$2,333	\$3,437	\$4,556	\$5,661
29-32	\$1,455	\$1,482	\$2,652	\$3,924	\$5,193	\$6,462
Covers	\$156	\$176	\$335	\$525	\$716	\$905

Minimum order is 50 copies. For orders larger than 500 copies, please consult Cadmus Reprints at 800-407-9190.

### Reprint Cover

Cover prices are listed above. The cover will include the publication title, article title, and author name in black.

### Shipping

Shipping costs are included in the reprint prices. Domestic orders are shipped via UPS Ground service. Foreign orders are shipped via a proof of delivery air service.

### Multiple Shipments

Orders can be shipped to more than one location. Please be aware that it will cost \$32 for each additional location.

### Delivery

Your order will be shipped within 2 weeks of the journal print date. Allow extra time for delivery.

### Tax Due

Residents of Virginia, Maryland, Pennsylvania, and the District of Columbia are required to add the appropriate sales tax to each reprint order. For orders shipped to Canada, please add 7% Canadian GST unless exemption is claimed.

### Ordering

Reprint order forms and purchase order or prepayment is required to process your order. Please reference journal name and reprint number or manuscript number on any correspondence. You may use the reverse side of this form as a proforma invoice. Please return your order form and prepayment to:

**Cadmus Reprints**  
P.O. Box 751903  
Charlotte, NC 28275-1903

*Note: Do not send express packages to this location, PO Box. FEIN #: 541274108*

Please direct all inquiries to:

**Rose A. Baynard**  
800-407-9190 (toll free number)  
410-819-3966 (direct number)  
410-820-9765 (FAX number)  
[baynardr@cadmus.com](mailto:baynardr@cadmus.com) (e-mail)

**Reprint Order Forms and purchase order or prepayments must be received 72 hours after receipt of form.**

**ANNEXE F**

**Publication n°6**

**Guiu B, Loffroy R, Petit JM, Aho S, Ben Salem D, Masson D, Hillon P,  
Cercueil JP, Krausé D.**

**Mapping of Liver Fat with Triple-Echo Gradient Echo Imaging:  
Validation Against 3.0-T Proton MR Spectroscopy.**

***Eur Radiol* 2009; 19: 1786-93.**

Boris Guiu  
Romaric Loffroy  
Jean-Michel Petit  
Serge Aho  
Douraid Ben Salem  
David Masson  
Patrick Hillon  
Jean-Pierre Cercueil  
Denis Krause

## Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy

Received: 31 August 2008  
Revised: 30 December 2008  
Accepted: 10 January 2009  
Published online: 27 February 2009  
© European Society of Radiology 2009

B. Guiu (✉) · R. Loffroy ·  
J.-P. Cercueil · D. Krause  
Department of Radiology, Le Bocage  
University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France  
e-mail: Boris.guiu@chu-dijon.fr  
Tel.: +33-380-293686  
Fax: +33-380-295455

B. Guiu  
Department of Clinical Research, Le  
Bocage University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

J.-M. Petit  
Department of Endocrinology, Le  
Bocage University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

S. Aho  
Department of Epidemiology, Le  
Bocage University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

D. Ben Salem  
Department of Neuroradiology, Le  
Bocage University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

J.-M. Petit · D. Masson  
INSERM U866 Unit, School of  
Medicine,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

P. Hillon  
Department of Hepatology, Le Bocage  
University Hospital,  
Bd Maréchal de Lattre de Tassigny,  
21000 Dijon, France

**Abstract** The purpose of this study was to validate a magnetic resonance imaging (MRI) technique for mapping liver fat, using  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) as the reference standard. In 91 patients with type 2 diabetes, 3.0-T single-voxel point-resolved  $^1\text{H}$ -MRS was used to calculate the liver fat fraction (LFF) from the water (4.76 ppm) and methylene (1.33 ppm) peaks, corrected for T1 and T2 decays. LFF (corrected for T1

and T2\* decays) was also obtained from the mean signal intensity on a map built from a triple-echo (consecutive in-phase, opposed-phase, and in-phase echo times) breath-hold gradient echo sequence, using basic image calculation functions (arithmetic mean, subtraction, division, multiplication by a numerical factor). Mean LFF was 8.9% (range, 0.9–33.5) by MRI and 8.8% (range, 0–34.1) by  $^1\text{H}$ -MRS. Pearson's coefficient was 0.976 ( $P < 0.0001$ ) and Lin's coefficient was 0.975 ( $P < 0.0001$ ). Liver segment had no significant influence. With Bland–Altman analysis, 95.6% (87/91) of data points were within the limits of agreement. Given its excellent agreement with  $^1\text{H}$ -MRS, our mapping technique can be used for visual and quantitative evaluation of liver fat in everyday practice.

**Keywords** Magnetic resonance spectroscopy · Liver fat · Mapping · Fat quantification

### Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses a broad spectrum of liver disorders, ranging from simple steatosis to steatohepatitis with or without fibrosis, which carries a risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. NAFLD may affect up to 30% of adults overall [2, 3], 76% of obese individuals [4] and 69.5% of patients with

diabetes [5]. Although liver biopsy is considered the reference standard for diagnosing NAFLD and for quantifying liver fat [6], its invasive nature and the high prevalence of NAFLD make it impractical for screening and monitoring [7].

Proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) has led to significant advances in the quantification of liver fat content (LFC) and is now regarded as the most accurate

noninvasive method [6]. However,  $^1\text{H}$ -MRS is not widely available, involves complex parameter settings and requires time-consuming post-processing to produce reliable results. We developed a new approach to circumvent these difficulties which involves a triple-echo (consecutive in-phase, opposed-phase and in-phase echo times) breath-hold spoiled gradient echo sequence [8].

This triple-echo acquisition was used to build an LFC map of the entire liver, particularly useful in patients with heterogeneously distributed liver fat, focal fatty infiltration, focal fatty sparing or focal lesions containing fat. Although the iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL) technique [9, 10] and multiecho MR imaging can produce such maps, they require either additional software or a specific integration to the MR system, which limits availability.

Since many studies [3, 8, 9, 11–16] support the assumption that liver fat fraction never exceeds 50%, magnitude-only images can be used for reliable quantification of liver steatosis. Thus, we developed a liver fat mapping technique which does not require additional calculations or software, since the map is built using basic image calculation functions (addition, subtraction, multiplication and division) to measure LFC in any region of interest (ROI) drawn on this map.

The aim of this study was to validate our mapping technique as a tool for LFC determination, using 3.0-T  $^1\text{H}$ -MRS as the reference standard.

## Materials and methods

### Patients

This prospective single-centre study was approved by our regional ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients before study inclusion.

Between January and June 2008, consecutive patients were screened prospectively at the endocrinology department for the following inclusion criteria: type 2 diabetes for at least 2 years, age older than 18 years and body weight less than 150 kg (the MRI table weight limit). Of the 104 patients who met these criteria, 6 refused to participate in the study. Contraindications to MRI were presence of a pacemaker ( $n=1$ ) or metallic implant ( $n=1$ ) and claustrophobia ( $n=2$ ). Of the 94 remaining patients, 3 were excluded because of equipment failure during MRI ( $n=1$ ) or uninterpretable spectra due to breathing ( $n=2$ ). Thus, the study was conducted in 91 patients with a mean age of 61 years (range, 37–83 years). There were 54 women (mean age, 61 years; range, 38–83 years; mean body mass index,  $35.6 \text{ kg/m}^2$ ; range,  $21.2\text{--}49.4 \text{ kg/m}^2$ ) and 37 men (mean age, 62 years; range, 37–81 years; mean body mass index,  $32.0 \text{ kg/m}^2$ ; range,  $20.7\text{--}45 \text{ kg/m}^2$ ).

### MR imaging

MR imaging and MR spectroscopy were performed during the same MR examination using a 3.0-T unit (Magnetom Trio Tim; Siemens, Erlangen, Germany) with a peak gradient amplitude of 45 mT/m and a time-to-peak of 204  $\mu\text{s}$ . A six-element body phased-array coil system was used.

All patients were carefully instructed to suspend respiration at end-inspiration and to be consistent in their breath-holds. To allow correct positioning, localizing sequences in the coronal, transverse and sagittal planes were acquired during a breath-hold. The second sequence, performed through the liver, was a transverse breath-hold low-T1-weighted two-dimensional triple-echo spoiled gradient echo sequence with the following parameters: repetition time (ms)/echo time (ms) of 192/2.46 (in-phase [ $\text{IP}_1$ ]), 3.69 (opposed-phase [OP]) and 4.92 (in-phase [ $\text{IP}_2$ ]); flip angle,  $20^\circ$ ; section thickness, 6 mm; intersection gap, 1.2 mm; matrix,  $256 \times 192$ ; number of sections, 25; and acquisition time, 34 s. Parallel imaging (with an acceleration factor of 2) was performed using generalized autocalibrating partially parallel acquisition (GRAPPA; Siemens Medical Solutions Erlangen, Germany). Two separate breath-holds (each lasting 17 s) were needed to cover the entire liver volume.

### $^1\text{H}$ -MR spectroscopy

Automated optimization of gradient shimming followed by manual adjustment of central frequency was performed, and water line widths of less than 40 Hz were obtained. Water suppression was not performed for any of the sequences.

Single-voxel MR spectroscopic data were acquired using seven breath-hold point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequences (repetition time, 5,000 ms; 3 acquisitions; 2,048 data points over 1,250-Hz spectral width; acquisition time, 15 s) with echo times of 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 135 ms to measure T2 relaxation times of water and methylene ( $\text{CH}_2$ ).

The same  $30 \times 30 \times 30 \text{ mm}$  (27 ml) voxel was used for these seven sequences and was positioned by a radiologist (15 years of experience with liver imaging) obliquely on segment VII on the transverse low-T1-weighted section (avoiding extrahepatic fat, large hepatic vessels, and organs adjacent to the liver) in 74 patients. In 17 randomly selected patients, the 27-ml voxel was positioned in segment IV to assess site-to-site reproducibility.

### $^1\text{H}$ -MR spectroscopic data analysis

$^1\text{H}$ -MR spectroscopic data were interpreted by a radiologist, who was blinded to the MR imaging results. The Java-



based MR user interface spectroscopic analysis package (jMRUI; A. van den Boogaart, Catholic University, Leuven, Belgium) [17] was used for time-domain analysis. Metabolite signals were analysed using the Advanced Magnetic Resonance (AMARES) fitting algorithm within jMRUI [18], which enables the inclusion of a large amount of prior knowledge. We measured the water peak at 4.76 ppm and the methylene peak at 1.33 ppm. Spectra were used only if homogeneity after shimming, measured as the full width at 50% peak height, was better than 0.45 ppm. Peak integrals were quantified by fitting to a Gaussian line shape.

T2 relaxation times of both metabolites were determined from their peak amplitudes at each echo time by using an exponential least-squares fitting algorithm. The peak areas of the methylene and water signals were then corrected for T2 effects (i.e. theoretical peak areas with 0 echo time), using the means of previously calculated T2 relaxation times, as reported elsewhere [8].

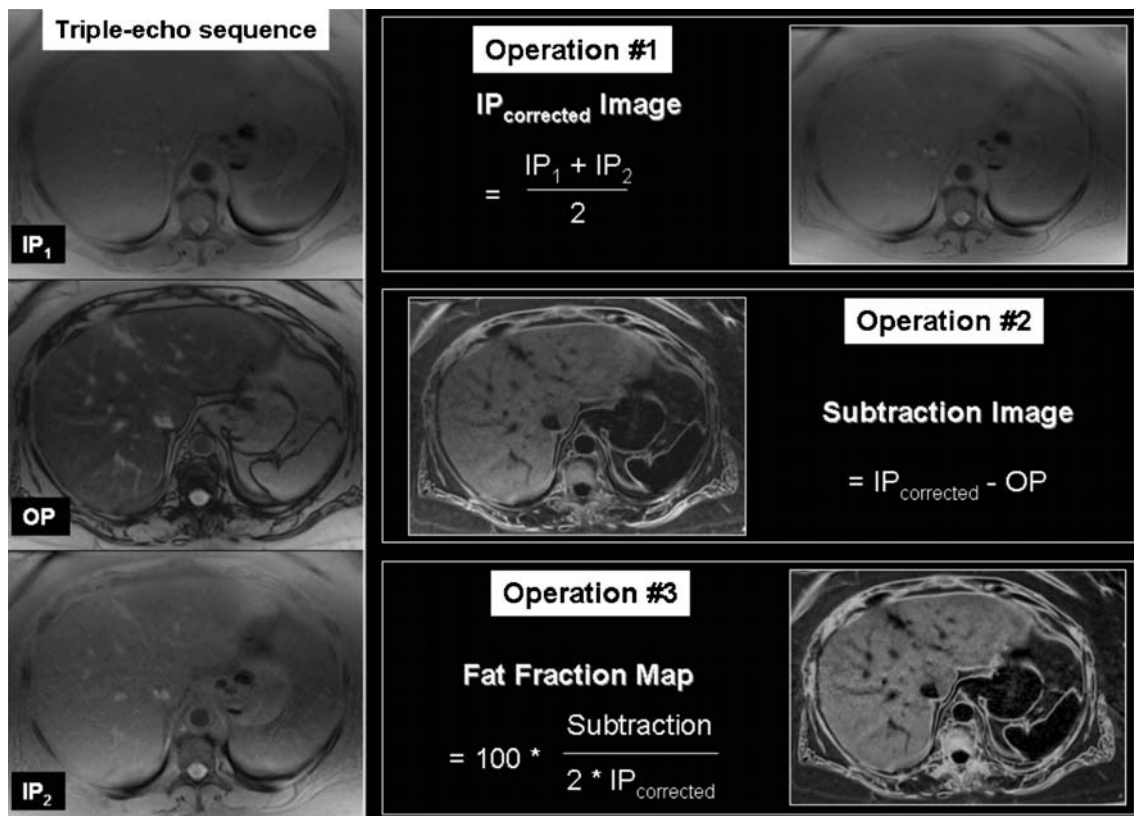
LFC was calculated as follows:

$$\% \text{Fat}_{\text{MRS}} = 100 \times A_{0\text{ms\_CH}_2} / (A_{0\text{ms\_CH}_2} + A_{0\text{ms\_WATER}})$$

where  $A_{0\text{ms\_CH}_2}$  and  $A_{0\text{ms\_WATER}}$  were the areas of the methylene and water peaks, respectively, corrected for both T1 and T2 effects.

#### Fat fraction map

Fat fraction MR maps were built and interpreted by a radiologist (5 years of experience with liver imaging), who was blinded to  $^1\text{H}$ -MRS findings. A fat fraction map was obtained from each section by using pixel-by-pixel image calculations performed on the workstation (Leonardo release VB13; Siemens, Erlangen, Germany), as follows (Fig. 1): a first image representing the IP signal intensity



**Fig. 1** MR images and liver fat map of a 58-year-old woman with type 2 diabetes and severe steatosis. The three MR images obtained from the triple-echo (consecutive in-phase [IP<sub>1</sub>], opposed-phase [OP] and in-phase [IP<sub>2</sub>] echo times) breath-hold spoiled gradient echo sequence (192/2.46, 3.69, 4.92; flip angle, 20°) are displayed on the left. The liver fat map (post-processing time less than 2 min for the entire liver) is built after three successive operations performed using basic image calculation functions. The IP<sub>corrected</sub> image represents the in-phase signal intensity corrected for T2\*

decay and is calculated using the “arithmetic mean” function of the workstation (*Operation #1*). A subtraction image is then obtained using the “subtraction” function of the workstation (*Operation #2*). Finally, the fat fraction map is obtained using the “division” function of the workstation applied to the subtraction image and IP<sub>corrected</sub> image then multiplying by 50 (*Operation #3*) to obtain direct measurements of the liver fat fraction (the signal of a pixel represents the percentage of liver fat)

corrected for T2\* decay ( $IP_{\text{corrected}}$  image) was calculated by using the “arithmetic mean” function of the workstation, applied to each pair of in-phase images ( $IP_1$  and  $IP_2$ ), since T2\* relaxation of the liver was assumed to be linear between  $IP_1$  and  $IP_2$ . A second image (subtraction image) was computed using the “subtraction” function of the workstation, applied to each pair of  $IP_{\text{corrected}}$  and OP images. Finally, the fat fraction map was calculated using the “division” function of the workstation, applied to each pair of subtraction and  $IP_{\text{corrected}}$  images then multiplying by 50 to produce direct measurements of the liver fat fraction (the signal of a pixel represents the percentage of LFC). The post-processing time necessary to build a complete liver fat map was consistently less than 2 min.

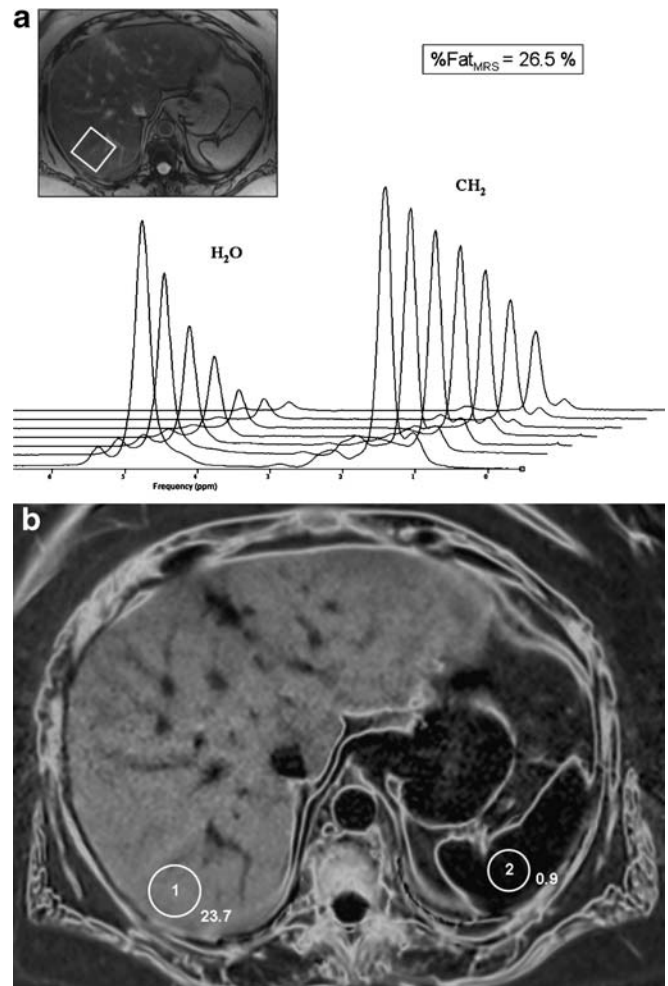
An ROI measuring 2–3 cm in diameter was drawn at the same site as the voxel used for  $^1\text{H}$ -MRS (segment VII in 74 patients and segment IV in 17 patients), avoiding extrahepatic fat and large vessels. Signal intensity in the ROI represented direct measurement of LFC ( $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$ ) within this ROI (Figs. 2 and 3). Finally, an ROI measuring 2–3 cm in diameter was drawn in the spleen, and the mean signal intensity (i.e. mean fat fraction) within this ROI was used as an internal standard.

### Statistical analysis

The localization of the voxel (and ROI) studied in each patient was represented by a binary variable called location, which was coded 0 when measurements were performed in segment VII and 1 when they were performed in segment IV. Agreement between  $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$  and  $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$ , as well as the potential influence of location, was assessed in three steps: First, the relationship between location and fat fraction measured by the two methods was estimated using simple linear regression. A robust variance estimator was used to take into account the non-Gaussian distributions of the two variables ( $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$  and  $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$ ) and heteroscedasticity (i.e. unequal variances). An additional analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Second, the relationship between  $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$  and  $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$  adjusted for location was assessed using multiple linear regression, with a robust variance estimator (this is equivalent to analysis of covariance). Finally, Pearson’s correlation coefficient between  $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$  and  $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$  was calculated. Agreement was estimated using the 95% limit-of-agreement method developed by Bland and Altman [19], in which the difference between  $\% \text{Fat}_{\text{MAP}}$  and  $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$  is plotted against their means, with the 95% confidence intervals. A rough indication of systematic bias and random error is provided by examining the direction and magnitude, respectively, of the scatter around the zero line. Heteroscedasticity can also be detected; it manifests as dependency of the difference on the magnitude of the mean. We computed Lin’s concordance coefficient correlation  $\rho_c$  [20]. Lin’s coefficient combines measures of precision and accuracy to

determine whether the observed data deviate significantly from the line of perfect concordance (i.e. the 45° line). Lin’s coefficient was considered complementary to the 95% limit-of-agreement. No adjustment for location was performed, since the influence of this variable was not statistically significant.

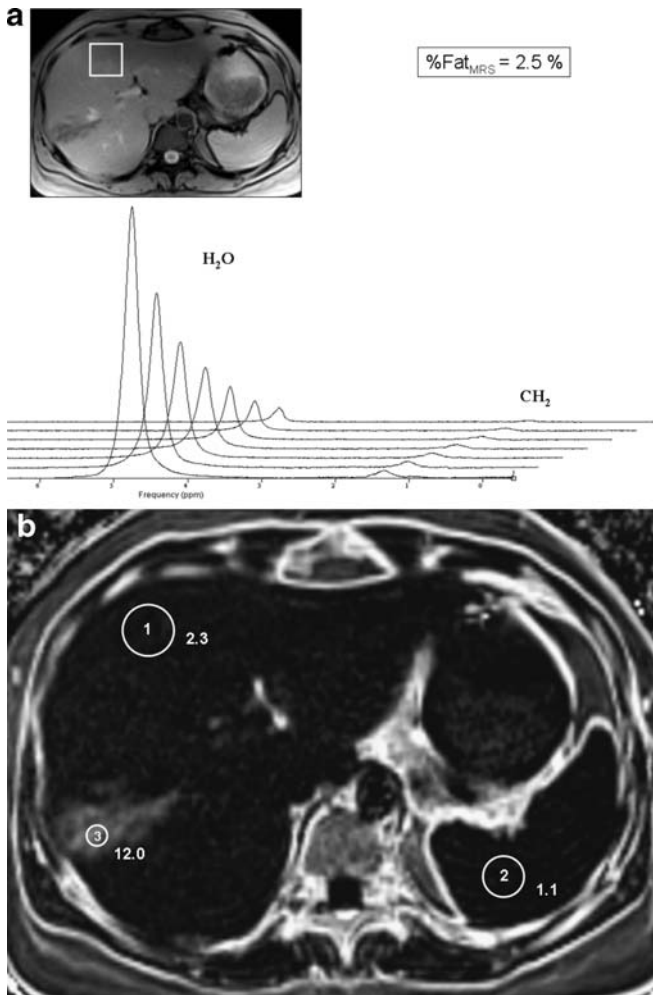
All statistical analyses were performed using STATA software version 10.0 (Statacorp, College Station, TX).  $P$  values less than 0.05 were considered significant.



**Fig. 2**  $^1\text{H}$ -MR spectra and liver fat map of a 58-year-old woman with type 2 diabetes and severe steatosis. **a** Top left transverse low-T1-weighted image (192/3.69). The square shows the position of the voxel in segment VII of the liver. Bottom  $^1\text{H}$ -MR spectra using seven breath-hold point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequences (repetition time, 5,000 ms; 3 acquisitions; voxel size, 27 ml) with echo times of 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 135 ms to calculate T2 relaxation times of water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and methylene ( $\text{CH}_2$ ) peaks. A long repetition time was used to limit T1 effects. Liver fat content ( $\% \text{Fat}_{\text{MRS}}$ ) corrected for both T1 and T2 decays was 26.5%. **b** On the liver fat map, severe steatosis is clearly visible, as the liver is very hyperintense compared with the spleen. Measurements of signal intensity in segment VII of the liver (1) and in the spleen (2) immediately provides the fat fraction within these regions of interest (23.7% and 0.9%, respectively)

## Results

Mean %Fat<sub>MAP</sub> was 8.9% (range, 0.9–33.5; SD, 7.9) and mean %Fat<sub>MRS</sub> was 8.8% (range, 0–34.1; SD, 8.1). Mean T2 times of water and methylene were 27.0 ms (range, 12.4–54.3 ms; SD, 6.6) and 61.0 ms (range, 28.0–82.2 ms; SD, 11.3), respectively. Mean fat percentage (fat fraction map) of the spleen was 1.1% (range, 0.6–1.7; SD, 0.3).



**Fig. 3** <sup>1</sup>H-MR spectra and liver fat map of a 41-year-old man with type 2 diabetes and an area of focal steatosis. **a** Top left transverse low-T1-weighted image (192/3.69). The square shows the position of the voxel in segment IV of the liver. Bottom <sup>1</sup>H-MR spectra using seven breath-hold point-resolved spatially localized spectroscopic pulse sequences (repetition time, 5,000 ms; 3 acquisitions; voxel size, 27 ml) with echo times of 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 135 ms to calculate T2 relaxation times of water (H<sub>2</sub>O) and methylene (CH<sub>2</sub>) peaks. A long repetition time was used to limit T1 effects. Liver fat content (%Fat<sub>MRS</sub>) corrected for both T1 and T2 decays was 2.5%. **b** On the liver fat map, measurements of signal intensity in segment IV of the liver (1), in the spleen (2) and in the hyperintense area of segment VII (3) immediately provides the fat fraction within these regions of interest (2.3%, 1.1% and 12.0% respectively). The liver fat map both depicts and quantitates the fat fraction in this area of focal steatosis

## Agreement between %Fat<sub>MRS</sub> and %Fat<sub>MAP</sub>

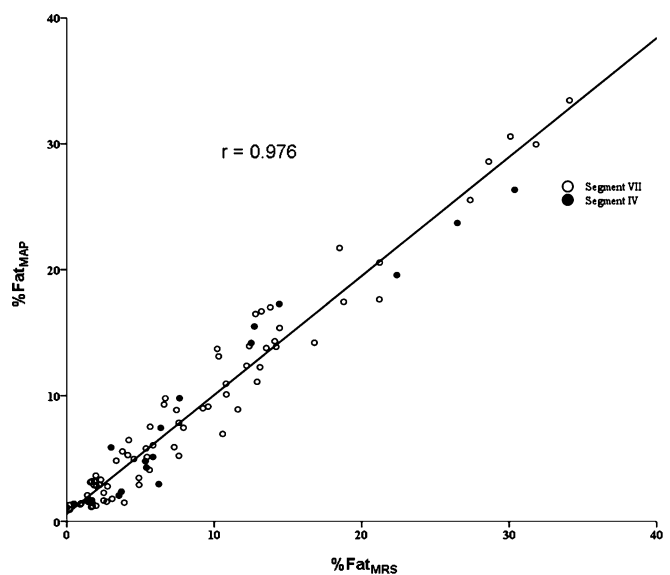
No significant relationships were found between %Fat<sub>MAP</sub> and location (simple linear regression,  $P=0.677$ ; Kruskal–Wallis,  $P=0.62$ ) or between %Fat<sub>MRS</sub> and location (simple linear regression,  $P=0.573$ ; Kruskal–Wallis,  $P=0.512$ ).

Multiple linear regression between %Fat<sub>MRS</sub> and %Fat<sub>MAP</sub> adjusted for location showed no statistically significant influence of location ( $P=0.75$ ). Figure 4 is the scatter plot between %Fat<sub>MRS</sub> and %Fat<sub>MAP</sub> by linear regression. Pearson's correlation coefficient and Lin's concordance coefficient were 0.976 ( $P<0.0001$ ) and 0.975 ( $P<0.0001$ ), respectively. On the Bland–Altman plot (Fig. 5), 95.6% (87/91) of points were within the limits of agreement.

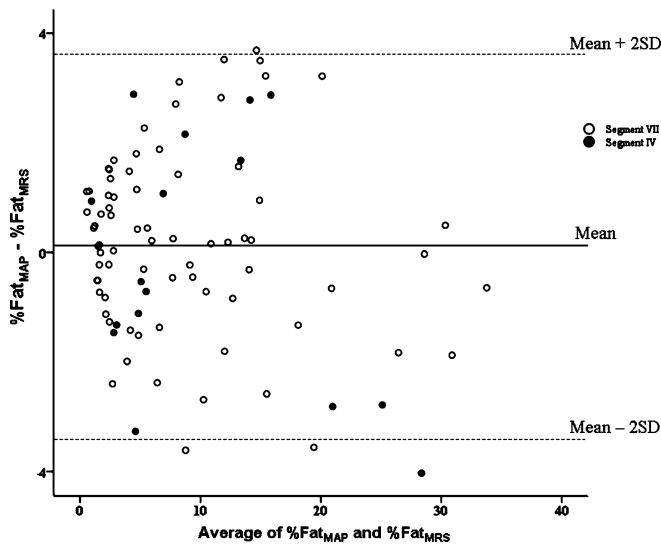
## Discussion

The mapping technique described here was derived from a triple-echo chemical shift gradient echo sequence, which was recently shown to provide accurate quantification of LFC in segment VII of the liver, compared with <sup>1</sup>H-MRS [8]. Since T1 relaxation times of normal liver and fat differ substantially (810 and 380 ms, respectively, at 3 T) [21], the triple-echo sequence was designed with a low (20°) flip angle to greatly reduce the T1 relaxation effect by minimizing T1 weighting [22]. For the same reason, all spectroscopic sequences were acquired with a TR (5 s) greater than five times T1.

Since T2\*-shortening is responsible for greater signal intensity loss as echo time increases, correction for T2\*



**Fig. 4** Scatter plot and regression line between liver fat contents calculated using <sup>1</sup>H-MRS and the mapping method, in segment VII (○, 74 patients) and segment IV (●, 17 patients). Strong correlation (Pearson's correlation coefficient,  $r=0.976$ ;  $P<0.0001$ ) and concordance (Lin's concordance coefficient,  $\rho_c=0.975$ ;  $P<0.0001$ ) were noted, with no statistically significant influence of site (segment VII or IV)



**Fig. 5** Differences between liver fat fractions estimated using  $^1\text{H}$ -MRS and the mapping technique were plotted against their means with the 95% confidence intervals (Bland–Altman plot). Approximately 4% of points were either above the upper (1 [1.1%] of 91) or below the lower (3 [3.3%] of 91) limits of agreement (dotted lines), corresponding to  $\pm 1.96$  SD (i.e. [−3.35%–3.60%]) from the mean

decay is required when determining LFC by dual- or multiecho imaging [23, 24], especially in patients with chronic liver disease (hepatitis C, NAFLD, cirrhosis or hemochromatosis), in whom iron deposition induces  $T2^*$ -shortening effects [24]. Although O’Regan et al. [16] recently reported an original biexponential curve-fitting model for deriving the relative signal contributions (and  $T2^*$ ) from fat and water, monoexponential regression from a dual-echo sequence is generally used for global  $T2^*$  estimations of the liver. Hussain et al. [22] used an additional dual-echo gradient echo sequence with two widely spaced IP echoes (4.5 ms and 18 ms at 1.5 T), whereas we used the two closely spaced IP echoes (2.46 ms and 4.92 ms at 3.0 T) of our triple-echo sequence, so that we did not need an additional acquisition. The phase interaction between the various functional groups (methine, diallylic,  $\alpha$ -methylene to carboxyl, allylic, methylene and methyl) within the constituent fatty acids [6, 25] can add considerable complexity to the observed signal variation with TE, especially at longer TEs [26]. This explains why we used the first two IP echoes (IP<sub>1</sub> and IP<sub>2</sub>) to calculate an IP<sub>corrected</sub> image corrected for  $T2^*$  decay. To simplify the calculations so that they could be performed on any workstation using basic image calculation functions, we assumed that  $T2^*$  relaxation of the liver was linear between the two IP echoes. This simplification is justified by the observations we made concerning  $T2^*$  relaxation of retroperitoneal fat, which is almost linear between these two echoes. Thus, IP<sub>corrected</sub> was obtained from the arithmetic mean of IP<sub>1</sub> and IP<sub>2</sub>. Furthermore, this method allowed us to reduce noise.

Although ultrasound is a useful technique for detecting hepatic steatosis, especially in severe cases, it is unable to

provide a precise determination of LFF [27]. Similarly, non-contrast-enhanced CT is very good for the qualitative diagnosis of steatosis of 30% or greater but its diagnostic performance for quantitative assessment of liver fat has been judged not clinically acceptable [28]. Consequently, we chose  $^1\text{H}$ -MRS as the reference standard to validate the results of our mapping technique, given  $^1\text{H}$ -MRS is now regarded as the most accurate noninvasive method [6]. Despite the high signal-to-noise ratio and the greater spectral resolution obtained with 3.0-T MR systems [29], we used a voxel size of 27 ml instead of 8 ml to further improve the signal-to-noise ratio and to acquire all spectroscopic sequences with a long TR (5 s) within a single breath-hold. Indeed, with an 8-ml voxel and a long TR, acquisition must be performed during free-breathing, which may affect the MR signal by increasing line width, doubling peaks or reducing peak intensities [17]. Thanks to the substantially decreased acquisition time, we obtained more robust acquisitions in our series since only 2.2% (2/93) patients had uninterpretable spectra compared with 7.5% (3/40) in the study validating the triple-echo method [8]. Furthermore, the  $T2$  relaxation times of methylene and water obtained in our study showed a considerable interindividual variability, confirming that correction for  $T2$  decay requires an individually computed rather than a theoretical value of  $T2$  [8, 30].

Our mapping technique does not solve the problem of fat–water ambiguity that is common to all chemical shift methods [16, 22, 31]. For example, on the fat fraction map, subcutaneous fat is slightly hyperintense and exhibits a mean signal intensity of less than 10 (i.e. 10% of fat content), whereas it should be higher than 90 (i.e. 90%). Multiecho MR imaging [16] and the IDEAL technique [9, 10] overcome this difficulty via multiecho acquisition and/or echo asymmetry but are not suitable for daily practice since they require either additional software or a specific integration to the MR system. Moreover, the problem of fat–water ambiguity is not of concern when assessing liver steatosis, since many recent studies involving  $^1\text{H}$ -MRS [9, 11–16] support the assumption that LFC does not exceed 50%. In particular, in the largest study, which included 2,349 patients, the highest fat percentage was 47.5% [3]. Percentages of liver fat found in this study are in good agreement with previously published literature concerning type 2 diabetic patients, since reported LFF were in the 0–45% range with median values between 8 and 19% [14, 32–34].

We measured mean signal intensity of the spleen (i.e. spleen fat content) as an internal standard [24, 35, 36], because the spleen is visible on most images of the liver and does not contain fat observable by MR imaging [31, 37], except in rare cases of Niemann–Pick disease [38]. With our mapping technique, the spleen fraction was about 1% and showed very little interindividual variability.

In our large cohort of patients, our mapping technique showed excellent agreement with  $^1\text{H}$ -MRS. We found

strong correlation ( $r=0.976$ ,  $P<0.0001$ ) and concordance ( $r=0.975$ ,  $P<0.0001$ ) coefficients. The Bland–Altman plot allowed us to assess the accuracy of the mapping technique, whose values are shown to be consistently within 4% of those obtained with the reference standard ( $^1\text{H-MRS}$ ). Moreover, since the comparison between  $^1\text{H-MRS}$  and the mapping method does not happen exactly over the same region of interest, the results are likely to have been influenced negatively. The map is easy to build on any workstation that provides the basic image calculation. No spatial misregistration errors occurred, given the design of the triple-echo sequence. Since both the post-processing time (less than 2 min) and acquisition time (within only two breath-holds of 17 s each) are very short, this mapping technique can be included routinely in all MR studies of the liver in everyday practice. Moreover, the good site-to-site reproducibility allows LFC measurement as soon as the map is built at any site in the liver, instead of only in one or a few voxels—an important advantage given the frequently heterogeneous distribution of fat. As reported for OP images subtracted from IP [39, 40], liver fat mapping is more helpful for detecting fatty infiltration, focal fatty sparing or focal lesions containing small amounts of fat than is visual inspection of IP and OP images. Finally, our method could easily be adapted for fat quantification and mapping in other organs such as the heart, muscle or spine.

Our study has several limitations. First, we used  $^1\text{H-MRS}$ , not biopsy, as the reference standard. Using liver biopsy is not ethically acceptable, as the procedure is invasive. Furthermore, recent data show that the heteroge-

neity of fat distribution throughout the liver limits the value of liver biopsy for fat quantification [41, 42]. Moreover,  $^1\text{H-MRS}$  assesses a far larger volume of liver tissue than liver biopsy does (about 27 g vs. 50–100 mg in a typical biopsy sample). Second, using our mapping technique to quantify fat in focal lesions may lead to fat–water ambiguity causing major underestimation of fat content in highly fatty lesions. Third, site-to-site reproducibility of our technique was assessed in segments VII and IV and, indirectly, in the spleen. Other liver segments were not tested, due to technical issues with the signal-to-noise ratio during  $^1\text{H-MRS}$  imaging, despite the use of a 3.0-T MR system. Fourth, the fat fraction measured using our technique, and most other MR-based methods, represents the signal derived from protons contained in the methylene functional group of fatty acid molecules, not the weight of lipids per unit of liver weight.

In conclusion, a fat map of the entire liver can be obtained easily and rapidly from two breath-hold triple-echo gradient echo sequences on a workstation providing basic image calculation functions. The mean signal intensity of any ROI drawn on this map immediately provides an accurate measurement of the liver fat fraction, showing excellent agreement with  $^1\text{H-MRS}$ . This mapping technique can be used for visual and quantitative evaluation of liver fat in everyday practice.

**Acknowledgments** This work was supported by a grant from the publicly funded organization Direction de la Recherche Clinique at the Dijon University Hospital, Dijon, France.

## References

- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M (2002) Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 123:134–140
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40:1387–1395
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL (2005) Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E462–E468
- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C (2000) Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 132:112–117
- Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G (2007) Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30:2119–2121
- Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, Thompson CH, Smith K, Ruell PA, Stannard SR, George J (2008) Non-invasive assessment of hepatic lipid composition: advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* 47:1513–1523
- Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE, Galloway GJ (2008) Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 28:937–945
- Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P, Krause D, Cercueil JP (2009) Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 250:95–102
- Kim H, Taksali SE, Dufour S, Befroy D, Goodman TR, Petersen KF, Shulman GI, Caprio S, Constable RT (2008) Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL. *Magn Reson Med* 59:521–527
- Reeder SB, Hargreaves BA, Yu H, Brittain JH (2005) Homodyne reconstruction and IDEAL water–fat decomposition. *Magn Reson Med* 54:586–593
- Browning JD (2006) Statins and hepatic steatosis: perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology* 44:466–471

12. Irwan R, Edens MA, Sijens PE (2008) Assessment of the variations in fat content in normal liver using a fast MR imaging method in comparison with results obtained by spectroscopic imaging. *Eur Radiol* 18:806–813
13. Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S (2008) Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 134:1369–1375
14. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H (2008) Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31:165–169
15. Machann J, Thamer C, Schoedt B, Stefan N, Haring HU, Claussen CD, Fritsche A, Schick F (2006) Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized 1H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med* 55:913–917
16. O'Regan DP, Callaghan MF, Wylezinska-Arridge M, Fitzpatrick J, Naoumova RP, Hajnal JV, Schmitz SA (2008) Liver fat content and T2\*: simultaneous measurement by using breath-hold multiecho MR imaging at 3.0 T-feasibility. *Radiology* 247:550–557
17. Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME (2006) 1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites. *Radiology* 240:318–332
18. Naressi A, Couturier C, Devos JM, Janssen M, Mangeat C, de Beer R, Graveron-Demilly D (2001) Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *Magma* 12:141–152
19. Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307–310
20. Lin LI (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45:255–268
21. de Bazelaire CM, Duhamel GD, Rofsky NM, Alsop DC (2004) MR imaging relaxation times of abdominal and pelvic tissues measured in vivo at 3.0 T: preliminary results. *Radiology* 230:652–659
22. Hussain HK, Chenevert TL, Londy FJ, Gulani V, Swanson SD, McKenna BJ, Appelman HD, Adusumilli S, Greenson JK, Conjeevaram HS (2005) Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display—early experience. *Radiology* 237:1048–1055
23. Alustiza JM, Castiella A (2008) Liver fat and iron at in-phase and opposed-phase MR imaging. *Radiology* 246:641
24. Westphalen AC, Qayyum A, Yeh BM, Merriman RB, Lee JA, Lamba A, Lu Y, Coakley FV (2007) Liver fat: effect of hepatic iron deposition on evaluation with opposed-phase MR imaging. *Radiology* 242:450–455
25. Guui B, Loffroy R, Cercueil JP, Krause D (2008) Multiecho MR imaging and proton MR spectroscopy for liver fat quantification. *Radiology* 249:1081
26. Bydder M, Yokoo T, Hamilton G, Middleton MS, Chavez AD, Schwimmer JB, Lavine JE, Sirlin CB (2008) Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging. *Magn Reson Imaging* 26:347–359
27. Mehta SR, Thomas EL, Bell JD, Johnston DG, Taylor-Robinson SD (2008) Non-invasive means of measuring hepatic fat content. *World J Gastroenterol* 14:3476–3483
28. Park SH, Kim PN, Kim KW, Lee SW, Yoon SE, Park SW, Ha HK, Lee MG, Hwang S, Lee SG, Yu ES, Cho EY (2006) Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment. *Radiology* 239:105–112
29. Fischbach F, Schirmer T, Thormann M, Freund T, Ricke J, Bruhn H (2008) Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the normal liver and malignant hepatic lesions at 3.0 Tesla. *Eur Radiol* 18(11):2549–2558
30. Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O (1994) Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance imaging* 12:487–495
31. Kim SH, Lee JM, Han JK, Lee JY, Lee KH, Han CJ, Jo JY, Yi NJ, Suh KS, Shin KS, Jo SY, Choi BI (2006) Hepatic macrosteatosis: predicting appropriateness of liver donation by using MR imaging—correlation with histopathologic findings. *Radiology* 240:116–129
32. Borra RJ, Salo S, Dean K, Lautamaki R, Nuutila P, Komu M, Parkkola R (2009) Nonalcoholic fatty liver disease: rapid evaluation of liver fat content with in-phase and out-of-phase MR imaging. *Radiology* 250:130–136
33. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, DeFronzo RA (2007) Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133:496–506
34. Lautamaki R, Borra R, Iozzo P, Komu M, Lehtimaki T, Salmi M, Jalkanen S, Airaksinen KE, Knuuti J, Parkkola R, Nuutila P (2006) Liver steatosis coexists with myocardial insulin resistance and coronary dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E282–E290
35. Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV (2005) Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques—initial experience. *Radiology* 237:507–511
36. Iannaccone R, Piacentini F, Murakami T, Paradis V, Belghiti J, Hori M, Kim T, Durand F, Wakasa K, Monden M, Nakamura H, Passariello R, Vilgrain V (2007) Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: helical CT and MR imaging findings with clinical-pathologic comparison. *Radiology* 243:422–430
37. Stark DD, Wittenberg J, Middleton MS, Ferrucci JT (1986) Liver metastases: detection by phase-contrast MR imaging. *Radiology* 158:327–332
38. Safanda J, Fakan F (1981) Histochemical and biochemical observations of the spleen in atypical Niemann–Pick disease and in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Histochem* 68:164–175
39. Yu JS, Chung JJ, Kim JH, Kim KW (2007) Fat-containing nodules in the cirrhotic liver: chemical shift MRI features and clinical implications. *AJR Am J Roentgenol* 188:1009–1016
40. Yu JS, Park JG, Jeong EK, Park MS, Kim KW (2007) Hepatic MRI using the double-echo chemical shift phase-selective gradient-echo technique. *AJR Am J Roentgenol* 188:W49–W56
41. Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, Weston SR, Pabst MS, Aouizerat BE, Bass NM (2006) Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 44:874–880
42. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, Capron F, Poynard T (2005) Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 128:1898–1906

## ANNEXE G

### Publication n°7

**Petit JM, Guiu B, Terriat B, Loffroy R, Robin I, Petit V, Bouillet B,  
Brindisi MC, Duvillard L, Hillon P, Cercueil JP, Verges B.**

**Nonalcoholic Fatty Liver is Not Associated with Carotid Intima-Media  
Thickness in Type 2 Diabetic Patients.**

***J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4103-6.**

## Nonalcoholic Fatty Liver Is Not Associated with Carotid Intima-Media Thickness in Type 2 Diabetic Patients

Jean Michel Petit, Boris Guiu, Beatrice Terriat, Romaric Loffroy, Isabelle Robin, Vincent Petit, Benjamin Bouillet, Marie-Claude Brindisi, Laurence Duvillard, Patrick Hillon, Jean-Pierre Cercueil, and Bruno Verges

Centre de Recherche, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 866 (J.M.P., B.B., M.-C.B., L.D., P.H., B.V.), Services de Diabétologie et Endocrinologie (J.M.P., I.R., B.B., M.-C.B., B.V.), Service de Radiologie (B.G., R.L., J.-P.C.), Service d'Angiologie (B.T., V.P.), and Service d'Hépatologie (P.H.), Centre Hospitalier Universitaire du Bocage, 21079 Dijon cedex, France

**Objective:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is commonly associated with obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. Several studies suggest that NAFLD is independently associated with an increased risk of cardiovascular disease in nondiabetic subjects. In type 2 diabetic subjects, the link between fatty liver and atherosclerosis is less clear. In this study, we set out to determine, whether fatty liver content, evaluated using 1H-magnetic resonance spectroscopy, a very precise imaging technique, was associated with atherosclerosis in people with type 2 diabetes.

**Research Design and Methods:** A total of 101 patients with type 2 diabetes mellitus were included in this study. Liver fat (1H-magnetic resonance spectroscopy) and carotid intima media thickness (IMT) were measured.

**Results:** Sixty-one (60.3%) patients had steatosis (hepatic triglyceride content greater than 5.5%). Liver fat content was correlated with fasting serum triglycerides ( $r = 0.22$ ;  $P = 0.02$ ) and alanine aminotransferase ( $r = 0.42$ ;  $P = 0.0001$ ). Sixty-eight percent of subjects with severe steatosis (hepatic triglyceride content greater than 15%) had aspartate aminotransferase in the normal range. Age was strongly correlated with IMT ( $r = 0.37$ ;  $P = 0.0002$ ). Steatosis did not correlate with IMT ( $r = -0.03$ ;  $P = 0.75$ ). There was no significant difference between the two groups (with and without hepatic steatosis) for IMT values.

**Conclusions:** this study suggests that in people with type 2 diabetes, fatty liver is not associated with cardiovascular disease. In a diabetic population, it seems that fatty liver is not a determinant factor associated with carotid IMT. (*J Clin Endocrinol Metab* 94: 4103–4106, 2009)

**N**onalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease in adults. Almost one third of the population in the United States has hepatic steatosis (1). NAFLD is commonly associated with obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes (2). Several studies suggest that NAFLD is independently associated with an increased risk of cardiovascular disease in

nondiabetic subjects (3–5). In subjects with type 2 diabetes, the link between fatty liver and atherosclerosis is less clear, and the different studies give conflicting results (6–8). In this study, we set out to determine whether NAFLD, evaluated using 1H-magnetic resonance (MR) spectroscopy, a very precise imaging technique, was associated with atherosclerosis in people with type 2 diabetes.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-0541 Received March 11, 2009. Accepted June 26, 2009.

First Published Online July 7, 2009

Abbreviations: ALAT, Alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; IMT, intima media thickness; LDL, low-density lipoprotein; MR, magnetic resonance; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease.



## Patients and Methods

### Patients

This prospective single-center study was approved by our regional ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients before study inclusion.

Between February and November 2008, consecutive patients were screened prospectively at the endocrinology department for the following inclusion criteria: type 2 diabetes for at least 2 yr, age older than 18 yr, and body weight less than 150 kg (the MR imaging-table weight limit). The inclusion criteria were: no known acute or chronic disease based on history, physical examination, and standard laboratory tests (blood counts, electrolyte concentrations); alcohol consumption less than 20 g/d; and no evidence of liver disease such as viral hepatitis. Patients who had received thiazolidinediones were excluded. The study was conducted in 101 patients with a mean age of 60.2 yr (range, 37–83 yr). There were 54 women [mean age, 60.7 yr; mean body mass index (BMI), 36.4 kg/m<sup>2</sup>] and 47 men (mean age, 59.7 yr; mean BMI, 32.9 kg/m<sup>2</sup>).

### 1H-MR spectroscopy

Liver fat content of the subjects was obtained using a 3.0 Tesla Magnetom TRIO TIM whole body system (Siemens, Erlangen, Germany) as previously described (9). Briefly, sagittal, coronal, and axial slices through the right lobe of the liver were acquired, and a 27-cm<sup>3</sup> spectroscopic volume of interest was positioned on segment VII. Single-voxel MR spectroscopic data were acquired using seven breath-hold PRESS sequences (repetition time, 1500 msec; eight acquisitions; and 2048 data points over 1250 Hz spectral width) with echo times of 30, 40, 50, 60, 80, 100, and 135 msec to measure T2 relaxation times of water and methylene. To minimize T1 effects, we acquired a free-breathing PRESS sequence (4000/30; 32 acquisitions; 2048 data points over 1250 Hz spectral width; acquisition time, 4 min). For each of the two voxel placements, automated optimization of gradient shimming followed by manual adjustment of central frequency was performed, and water line widths of 40–50 Hz were obtained.

The Java-based MR user interface spectroscopic analysis package was used for the time-domain analysis. Metabolite signals were analyzed using the Advanced Magnetic Resonance (AMARES) fitting algorithm within jMRUI, which enables the inclusion of a large amount of prior knowledge. We measured the water peak at 4.7 ppm and the methylene peak at 1.3 ppm. Spectra were used only if homogeneity after shimming was better than 0.45 ppm, measured as the full width at 50% peak height. Peak integrals were quantified by fitting to a Gaussian line shape. Finally, liver fat content was calculated as previously reported (9). Hepatic steatosis was defined as a hepatic triglyceride content greater than 5.5% (1).

### Intima media thickness (IMT)

In all subjects, carotid IMT was measured by high-resolution real-time B mode ultrasonography with a 7.5-MHz linear transducer (Philips HD 11). Each subject was examined in the supine position. The carotid arteries were investigated bilaterally in longitudinal projections. The examination included sections of approximately 2–3 cm of common carotid artery just below the carotid bulb. IMT was defined as the distance between the leading edge of the first echogenic line (lumen-intima interface) and the second echogenic line (media-adventitia interface) of the far

wall. IMT was measured at a plaque-free point with a specially designed computer program (Philips Qlab 6.0). Three measurements from both sites were averaged to give the mean IMT.

### Analytical procedures

Plasma glucose, glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), fasting serum high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, fasting low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, fasting serum triglycerides, and plasma liver enzymes were determined by standard procedures.

### Statistical analysis

Results are expressed as means + SD. Comparisons between groups were made using the Student's test or the Mann-Whitney *U* test for continuous variables and the  $\chi^2$  or Fisher exact probability test for categorical data. Statistical correlations were determined by the nonparametric Spearman test. Probability levels lower than 0.05 were considered significant.

## Results

Table 1 shows the clinical and biochemical characteristics of the study population. In this population, 53 (52.4%) patients were treated with metformin and 42 (41.5%) with sulfonylurea. The percentage of patients treated with insulin was 59.4% (*n* = 60); 57 (56.4%) were treated with statins, and 11 (10.8%) were treated with fibrates therapy. A total of 24 (23.7%) patients had diabetic retinopathy. The prevalence of microalbuminuria and overt nephropathy was 63.2%. Sixty-one patients (60.3%) had steatosis (hepatic triglyceride content greater than 5.5%). There was no significant difference between the two groups (with and without hepatic steatosis) for levels of fasting plasma glucose and HbA<sub>1c</sub> (Table 1). The duration of diabetes and BMI were similar in the two groups. Liver fat content was correlated with fasting serum triglycerides (*r* = 0.22; *P* = 0.02), aspartate aminotransferase (ASAT) (*r* = 0.19; *P* = 0.05), and alanine aminotransferase (ALAT) (*r* = 0.42; *P* < 0.0001). However, 78.6% of subjects with steatosis (liver content > 5.5%) had ASAT or ALAT in the normal range. In the same way, 68% of type 2 diabetic subjects with severe steatosis (liver content > 15%) had ASAT or ALAT in the normal range.

### IMT

Age was strongly correlated with IMT (*r* = 0.37; *P* = 0.0002). The correlation between the duration of diabetes and IMT was borderline significant (*r* = 0.18; *P* = 0.06). Measures of glucose or HbA<sub>1c</sub> did not correlate with IMT. Steatosis did not correlate with IMT (*r* = -0.03; *P* = 0.75). There was no significant correlation between IMT and liver fat content after dividing steatosis into tertiles (tertile 1, IMT = 0.74 ± 0.14; tertile 2, IMT = 0.76 ± 0.16; and tertile 3, IMT = 0.74 ± 0.12; *P* = 0.83).

**TABLE 1.** Subjects' characteristics according to the presence of steatosis

	Fatty liver content <5.5%	Fatty liver content >5.5%	P value
n	40	61	
Age (yr)	60.1 ± 8.7	60.3 ± 11.7	0.89
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.1 ± 5.9	35.1 ± 6.4	0.56
Sex (male)	20 (50.0%)	27.2% (44.2%)	0.71
Duration of diabetes (yr)	14.6 ± 10.3	11.6 ± 9.6	0.11
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.7 ± 2.2	8.5 ± 1.8	0.85
ASAT (units/liter)	25 ± 7	38 ± 84	0.42
ALAT (units/liter)	29 ± 15	42 ± 23	0.001
GGT (units/liter)	78 ± 100	82 ± 96	0.47
Total cholesterol (mmol/liter)	4.98 ± 1.18	4.81 ± 0.90	0.51
HDL cholesterol (mmol/liter)	1.08 ± 0.91	1.12 ± 0.26	0.35
LDL cholesterol (mmol/liter)	3.11 ± 1.10	2.73 ± 0.68	0.17
Triglycerides (mmol/liter)	1.84 ± 1.15	2.27 ± 1.78	0.04
Statin therapy	25 (62.5%)	32 (52.4%)	0.42
Sulfonylureas therapy	14 (35.0%)	28 (45.9%)	0.30
Metformin therapy	13 (32.5%)	40 (65.5%)	0.002
Insulin therapy	28 (70%)	32 (52.4%)	0.10
Carotid IMT (mm)	0.74 ± 0.13	0.75 ± 0.15	0.65

Data are presented as mean ± SE or number. GGT,  $\gamma$ -Glutamyl transferase.

## Discussion

In the present study, we observed that liver fat content in patients with type 2 diabetes mellitus is not associated with carotid atherosclerosis evaluated by IMT. We found that serum ALAT was in the normal range in 68% of subjects with type 2 diabetes with more than 15% fat content in the liver. These results confirm that ALAT is a poor predictor of fatty liver, as suggested by a previous study (10). In this study, Kotronen *et al.* (10) showed that patients with type 2 diabetes had 40–200% more liver fat at the same ALAT and ASAT concentrations than the nondiabetic subjects.

Several studies have suggested that there is an association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease (3–6). Most of these used IMT as a marker of early atherosclerosis in nondiabetic patients, and the presence of steatosis was usually evaluated using sonography. In healthy subjects and in subjects with metabolic syndrome, steatosis was associated with IMT (3, 4). It is important to determine whether NAFLD is an independent predictor of cardiovascular morbidity and mortality. Steatosis is now believed to be the hepatic manifestation of the metabolic syndrome (11). Fatty liver is associated with a higher prevalence of metabolic syndrome, dyslipidemia, and type 2 diabetes mellitus (12–14). We cannot exclude the possibility that a proatherogenic serum lipid profile and the metabolic syndrome, which is commonly observed in subjects with fatty liver, are in part responsible for the relationships observed between fatty liver and atherosclerosis (15). However, in recent studies, it seems that subjects with ultrasound-diagnosed steatosis have an increased incidence of cardiovascular events that is independent of components of the metabolic syndrome

(3, 4). One hypothesis could be a direct link between fatty liver and dyslipidemia, endothelial dysfunction, or oxidative stress, and thus atherosclerosis (15). In nondiabetic subjects, it has been shown that fatty liver correlates strongly with circulating HDL2 and the HDL2-to-HDL3 cholesterol ratio, even after adjustment for insulin resistance (16). In the same way, in diabetic patients, the presence of hepatic steatosis was associated with elevated serum triglycerides; small, dense LDL; and reduced HDL (17). However, almost all of the studies in which independent associations between fatty liver and atherosclerosis were found in nondiabetic subjects did not adequately evaluate the impact of visceral adipose tissue and insulin sensitivity (8). Moreover, in the majority of these studies, the diagnosis of fatty liver was based on ultrasonography, which is not considered the best method to measure fatty liver. For patients with type 2 diabetes, two studies have evaluated the relationship between carotid atherosclerosis and fatty liver with conflicting conclusions (6, 7). Targher *et al.* (6) showed that fatty liver evaluated by patient history and liver ultrasound was associated with a higher prevalence of cardiovascular disease in people with type 2 diabetes. A limitation of this study was that the diagnosis of NAFLD was based on ultrasonography, a method that allows the detection of steatosis only when fat on liver biopsy exceeds 33% (18). In contrast, McKimmie *et al.* (7) demonstrated that fatty liver evaluated by computed tomography was not associated with carotid intimal thickness in people with a high prevalence of type 2 diabetes mellitus (82%). In this study, the authors suggested that hepatic steatosis was less likely to be a direct mediator of subclinical cardiovascular disease and may instead be an

epiphenomenon (7). Our study using 1H-MR spectroscopy, which is considered the most accurate noninvasive method for measuring liver fat, is in agreement with this work. The 1H-MR spectroscopy method measures the percentage of fat in the liver and, unlike other noninvasive methods like ultrasonography or computed tomography, provides a very precise evaluation of steatosis.

In conclusion, this study suggests that in people with type 2 diabetes, fatty liver is not associated with carotid IMT. In a diabetic population, it seems that fatty liver is not a determinant factor associated with cardiovascular disease.

## Acknowledgments

We thank the Dr. C. Bonithon-Kopp of the Centre d'Investigation Clinique—Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon for assistance with this study.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. J. M. Petit, Service de Diabétologie et d'Endocrinologie, Centre Hospitalier Universitaire du Bocage, BP 77908, 21079 Dijon cedex, France. E-mail: jean-michel.petit@chu-dijon.fr.

This work was supported by the Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (PHRC 2007) and by l'Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

1. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH 2004 Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40:1387–1395
2. Angulo P 2002 Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346:1221–1231
3. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G 2006 Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 29:1325–1330
4. Sookoian S, Pirola CJ 2008 Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 49:600–607
5. Targher G, Marra F, Marchesini G 2008 Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia* 51:1947–1953
6. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G 2007 Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30:2119–2121
7. McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, Bowden DW, Freedman BI, Register TC, Hsu FC, Lohman KK, Weinberg RB, Wagenknecht LE 2008 Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Am J Gastroenterol* 103:3029–3035
8. Picardi A, Vespasiani-Gentilucci U 2008 Association between non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: a first message should pass. *Am J Gastroenterol* 103:3036–3038
9. Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P, Krause D, Cercueil JP 2009 Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 250:95–102
10. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Cornér A, Bergholm R, Yki-Järvinen H 2008 Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31:165–169
11. Kotronen A, Yki-Järvinen H 2008 Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:27–38
12. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M 2002 Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35:367–372
13. Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH 2007 Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care* 30:734–743
14. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H 2007 Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3490–3497
15. Stefan N, Kantartzis K, Häring HU 2008 Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocr Rev* 29:939–960
16. Kantartzis K, Rittig K, Cegan A, Machann J, Schick F, Balletshofer B, Fritsche A, Schleicher E, Häring HU, Stefan N 2008 Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care* 31:366–368
17. Toledo FG, Sniderman AD, Kelley DE 2006 Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:1845–1850
18. McCullough AJ 2004 The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 8:521–533, viii

## ANNEXE H

### **Publication n°8**

**Petit JM, Guiu B, Masson D, Duvillard L, Jooste V, Buffier P, Terriat B,  
Bouillet B, Brindisi MC, Loffroy R, Robin I, Hillon P, Cercueil JP,  
Verges B.**

**Specifically-PNPLA3-Mediated Accumulation of Liver Fat in Obese  
Patients with Type 2 Diabetes.**

***J Clin Endocrinol Metab* 2009; Accepted.**

## Specifically PNPLA3-Mediated Accumulation of Liver Fat in Obese Patients with Type 2 Diabetes

Jean-Michel Petit, Boris Guiu, David Masson, Laurence Duvillard, Valerie Jooste, Perrine Buffier, Beatrice Terriat, Benjamin Bouillet, Marie-Claude Brindisi, Romaric Loffroy, Isabelle Robin, Patrick Hillon, Jean-Pierre Cercueil, and Bruno Verges

Université de Bourgogne (P.J.M., B.G., D.M., L.D., V.J., B.B., M.-C.B., P.H., B.V.), Centre de Recherche Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 866; Services de diabétologie et endocrinologie (P.J.M., P.B., B.B., M.-C.B., I.R., B.V.) de radiologie (B.G., R.L., J.-P.C.), d'angiologie (B.T.), and d'hépatologie (P.H.), Centre Hospitalier Universitaire du Bocage, BP 77908, 21079 Dijon cedex, France

**Context:** Recently, it has been shown in the general population that an allele in the adiponutrin (PNPLA3) gene was strongly associated with increased liver fat content (LFC), independently of visceral adiposity and insulin resistance.

**Objective:** In this study, we set out to determine whether LFC, evaluated using  $^1\text{H}$ -MR spectroscopy, was associated with PNPLA3 rs738409 polymorphism in people with type 2 diabetes. We also evaluated the influence of this polymorphism on the relationship between LFC and either visceral adiposity or carotid intima media thickness (CIMT).

**Design, Settings, and Participants:** A total of 218 type 2 diabetic patients were included in this study.

**Main Outcome Measures:** LFC, area of visceral fat, and CIMT were measured.

**Results:** A total of 139 (63.7%) patients had steatosis. The rs738409 minor G allele was associated with LFC. The number of patients with steatosis was significantly higher among minor G allele carriers in comparison to C allele homozygote carriers (70.3 vs. 57.2%;  $P = 0.04$ ). In the subgroup of C allele homozygote carriers, LFC correlated with body mass index ( $r = 0.27$ ;  $P = 0.003$ ) and visceral fat area ( $r = 0.30$ ;  $P = 0.002$ ), but not with CIMT. In the subgroup of minor G allele carriers, LFC correlated inversely with CIMT ( $r = -0.23$ ;  $P = 0.03$ ), but not with body mass index or with visceral fat area. In multivariate logistic regression, the relationship between the highest quartile of CIMT and steatosis was different according to adiponutrin polymorphism.

**Conclusions:** This study confirms that in people with type 2 diabetes, LFC is related to rs738409 polymorphism. The lack of a relationship with visceral obesity and the inverse correlation with CIMT suggest that fatty liver associated with the minor G allele of the PNPLA3 rs738409 polymorphism may not be linked to metabolic disorders. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 0000–0000, 2010)

**N**onalcoholic fatty liver disease is commonly associated with obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes (1). Recently, it has been shown in the general population that an allele in the adiponutrin (PNPLA3) gene (rs738409[G]) was strongly associated with in-

creased liver fat content independently of visceral adiposity and insulin resistance (2, 3). The function of adiponutrin is not well known, but it has been suggested that this protein has both lipogenic and lipolytic properties (2, 3). In this study, we set out to determine whether liver fat

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2010-0814 Received April 8, 2010. Accepted August 3, 2010.

Abbreviations: ALAT, Alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CIMT, carotid intima media thickness; HbA1c, glycosylated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

content, evaluated using  $^1\text{H}$ -MR spectroscopy, a very precise imaging technique, was associated with rs738409 adiponutrin polymorphism in people with type 2 diabetes. Moreover, we determined the relationship between visceral fat area measured by abdominal magnetic resonance, liver fat content, and PNPLA3 rs738409 polymorphism. We also evaluated the influence of PNPLA3 rs738409 polymorphism on the relationship between liver fat content and carotid intima media thickness (CIMT). We hypothesized that PLPNA3 allelic variation could modulate the association between liver fat content and specific parameters such as visceral fat area or carotid atherosclerosis. Because, there is dissociation between fatty liver and insulin resistance in subjects carrying the minor variant of PLPNA3 gene, we speculate that in type 2 diabetic patients, fatty liver associated with this polymorphism must not be linked to carotid atherosclerosis.

## Patients and Methods

This prospective single-center study was approved by our regional ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients before inclusion in the study.

Between February 2008 and November 2009, consecutive patients were screened prospectively at the endocrinology department for the following inclusion criteria: type 2 diabetes, the absence of acute or chronic disease based on the patient's medical history, physical examination, standard laboratory tests (blood counts, electrolyte concentrations), and alcohol consumption of less than 20 g/d. Patients who had received thiazolidinediones were excluded. The study was conducted in 218 patients with a mean age of  $61.7 \pm 9.9$  yr. There were 111 women [mean age, 62.0 yr; mean body mass index (BMI),  $35.6 \text{ kg/m}^2$ ] and 107 men (mean age, 61.3 yr; mean BMI,  $32.7 \text{ kg/m}^2$ ).

## Evaluated parameters

### Liver fat content

Liver fat content of the subjects was evaluated using  $^1\text{H}$ -MR spectroscopy with a 3.0 Tesla Magnetom TRIO TIM whole body system (Siemens, Erlangen, Germany) as previously described (4). Liver fat content, calculated as the ratio of signal from methylene to total signal from methylene and water, was converted to a weight fraction as previously reported (5–7) using the following factors: the ratio of the number of lipid protons in the fitted methylene signal to the total number of lipid protons was 0.6332; proton densities of fat and water were 110 and 111 mol/liter, respectively; 1 g liver tissue contained 711 mg water; and densities of the liver tissue, fat in the liver, and water were 1.051 g/ml, 0.900 g/ml, and 1.000 g/ml, respectively. Hepatic steatosis was defined as liver fat content of at least 55.6 mg triglycerides/g liver tissue (*i.e.*  $\geq 5.56\%$  of liver tissue weight) (6, 7).

A single-slice axial T1-weighted image at the level of the L4/L5 intervertebral disc was analyzed to measure the cross-sectional area of visceral fat (8). Plasma glucose, glycosylated hemoglobin (HbA1c), fasting serum high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, fasting low-density lipoprotein (LDL) cho-

lesterol, fasting serum triglycerides, and plasma liver enzymes were determined by standard procedures.

### Carotid intima media thickness

In all subjects, CIMT was measured by high-resolution real-time B mode ultrasonography with a 7.5-MHz linear transducer (Philips HD 11) as previously described (9). Each subject was examined in the supine position. The carotid arteries were investigated bilaterally in longitudinal projections. The examination included sections of approximately 2–3 cm of common carotid artery just below the carotid bulb. CIMT was defined as the distance between the leading edge of the first echogenic line (lumen-intima interface) and the second echogenic line (media-adventitia interface) of the far wall. CIMT was measured at a plaque-free point with a specially designed computer program (Philips Qlab 6.0). Three measurements from both sites were averaged to give the mean CIMT.

### Mutation detection

Genotyping was performed by real-time PCR followed by melting curve analysis using hybridization probes. Primers 5'-TGT-GAGCACTTCAGAGGC-3' (forward) and 5'-GAGAAAGCT-TATGAAGGATCAGG-3' (reverse) were used to amplify a 198-bp fragment of the human adiponutrin gene that harbors the rs738409 single nucleotide polymorphism. The mutation probe (5'-ACTG-TAGAAGGGGATGAAGC-3') was labeled at the 3' end with fluorescein; the anchor probe (5'-ACATACCAAGGCCTGT-GAAAGCA-3') was labeled with Red 640 at its 5' end and phosphorylated at the 3' end. The melting temperatures of the mutation probe were 58 and 45 C for each allele, respectively. The analysis was carried out on a Light Cycler 480 real-time PCR system (Roche Applied Science, Meylan, France). PCR and melting temperature analysis were performed with the LightCycler 480 genotyping master kit (Roche Applied Science) using the standard procedures provided by the manufacturer.

### Statistical analysis

Comparisons between groups were made using Student's test, or the Mann-Whitney *U* test and the  $\chi^2$  or Fisher exact probability test for categorical data. Statistical correlations were determined by the nonparametric Spearman test. Probability levels lower than 0.05 were considered significant. Multivariate logistic regression models were fitted to identify independent factors associated with: 1) steatosis—the interaction between adiponutrin polymorphism and visceral fat area on steatosis was tested; and 2) last quartile of CIMT—the interaction between adiponutrin polymorphism and steatosis on CIMT was tested. Factors were considered independently associated with outcome parameters if the *P* value was lower than 0.05.

## Results

A total of 139 patients (63.7%) had steatosis (hepatic triglyceride content greater than 55.6 mg triglycerides/g liver tissue). Table 1 shows the clinical and biochemical characteristics of the study population. In this population, 119 (54.5%) patients were treated with metformin and 106 (48.6%) with sulfonylurea. The percentage of patients

**TABLE 1.** Characteristics of subjects according to the presence of steatosis

	Liver fat content <55.6 mg triglycerides/g liver tissue	Liver fat content >55.6 mg triglycerides/g liver tissue	P value
n	79	139	
Liver fat content (mg triglycerides/g liver tissue)	23.3 (17.0; 35.6)	133.5 (90.7; 211.5)	
Age (yr)	63.3 ± 10.0	60.7 ± 9.8	0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.9 ± 6.6	34.9 ± 6.1	0.01
Sex, no. of males (%)	42 (53.1)	65 (46.7)	0.39
Duration of diabetes (yr)	14.5 (7; 21.5)	10 (3; 16.5)	0.003
HbA1c (%)	8.6 ± 1.9	8.5 ± 1.7	0.81
ASAT (U/liter)	19.6 ± 9.3	26.9 ± 17.5	0.008
ALAT (U/liter)	31.6 ± 36.7	42.8 ± 22.5	<0.001
GGT (U/liter)	56.5 ± 77.2	71.7 ± 78.5	0.001
Total cholesterol (mmol/liter)	4.62 ± 1.15	4.90 ± 1.27	0.07
HDL cholesterol (mmol/liter)			
Females	1.15 ± 0.27	1.14 ± 0.24	0.94
Males	1.00 ± 0.27	1.03 ± 0.24	0.57
LDL cholesterol (mmol/liter)	2.72 ± 0.99	2.86 ± 0.95	0.32
Triglycerides (mmol/liter)	1.53 (1.1; 2.15)	2.02 (1.37; 2.83)	0.004
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	230 (176; 303)	281 (211; 335)	0.005
CIMT (mm)	0.74 (0.64; 0.80)	0.72 (0.64; 0.81)	0.85

Data are expressed as means ± sd or median (interquartile range), unless described otherwise. GGT,  $\gamma$ -Glutamyl transferase.

treated with insulin was 59.6% (n = 130), and 110 (50.4%) were treated with statin therapy.

There was no significant difference between the two groups (with and without hepatic steatosis) for levels of fasting plasma glucose and HbA1c. Patients with steatosis had a higher BMI (34.9 ± 6.3 vs. 32.9 ± 6.6 kg/m<sup>2</sup>; P = 0.01), higher visceral fat area [281 (211; 335) vs. 230 (176; 303) cm<sup>2</sup>; P = 0.005], higher plasma alanine aminotransferase (ALAT) levels (42.8 ± 22.5 vs. 31.6 ± 36.7 IU/liter; P < 0.001), and higher plasma triglyceride levels [2.02 (1.37; 2.83) vs. 1.53 (1.10; 2.15) mmol/liter; P = 0.004] than did patients without steatosis (Table 1). There was no significant difference between men and women for fatty liver content (97.7 ± 85.1 vs. 117.8 ± 94.8 mg triglycerides/g liver tissue; P = 0.08, respectively).

#### Adiponutrin polymorphism and liver fat content

The frequencies of G and C alleles of PNPLA3 (rs738409) were 29.6 and 70.4%, respectively, values that are not significantly different from those reported in previous studies (10, 11). In our population, carriers of the rs738409 minor G allele had a higher liver fat content than carriers of the C allele homozygote [99.6 (46.4; 163.4) vs. 66.5 (25.9; 136.2) mg triglycerides/g liver tissue; P = 0.04]. The number of patients with steatosis was significantly higher among minor G allele carriers in comparison to C allele homozygote carriers (70.3 vs. 57.2%; P = 0.04) (Table 2). Circulating triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, aspartate aminotransferase (ASAT), and ALAT levels were similar for minor G and C allele homozygote carriers (Table 2). Interactions between

gender and adiponutrin polymorphism were tested for the presence of steatosis and were not significant.

#### Influence of PNPLA3 rs738409 polymorphism on the relationship between liver fat content and regional obesity

In the population as a whole, liver fat content correlated with BMI (r = 0.16; P = 0.01), and visceral fat area (r = 0.18; P = 0.01). In the subgroup of C allele homozygote carriers (n = 110), liver fat content correlated with BMI (r = 0.27; P = 0.003), and visceral fat area (r = 0.30; P = 0.002). In the subgroup of minor G allele carriers (n = 108), liver fat content did not correlate with either BMI (r = 0.05; P = 0.58) or visceral fat area (r = 0.06; P = 0.51). In the subgroup of C allele homozygote carriers, patients with steatosis had a significantly higher visceral fat area (Table 3). In multivariate logistic regression, visceral fat area was positively and significantly associated with steatosis in C allele homozygote carriers but not among minor G allele carriers (Table 4). The different relationship between visceral fat area and steatosis was marginally significant according to adiponutrin polymorphism (P value for interaction = 0.10).

#### Influence of PNPLA3 rs738409 polymorphism on the relationship between liver fat content and CIMT

In the population as a whole, liver fat content did not correlate with CIMT (r = -0.10; P = 0.18). Age and duration of diabetes correlated strongly with CIMT (r = 0.33, P < 0.0001; and r = 0.23, P = 0.001, respectively).

**TABLE 2.** Clinical and metabolic characteristics of type 2 diabetic patients according to PNPLA3 rs738409 polymorphism

	Minor G allele carriers (GG/CG)	C allele homozygote (CC)	P value
n	108	110	
Age (yr)	61.3 ± 10.2	62.1 ± 9.7	0.52
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.0 ± 6.2	34.4 ± 6.6	0.72
Sex, no. of males (%)	52 (48.1)	55 (50.0)	0.89
Duration of diabetes (yr)	12 (5; 20)	11 (5; 17)	0.82
HbA1c (%)	8.45 ± 1.77	8.70 ± 1.90	0.41
ASAT (U/liter)	23.5 ± 12.1	25.0 ± 18.2	0.99
GGT (U/liter)	55.3 ± 43.9	76.9 ± 100.3	0.85
ALAT (U/liter)	36.4 ± 18.2	41.0 ± 36.4	0.86
Total cholesterol (mmol/liter)	4.83 ± 1.12	4.78 ± 1.16	0.53
HDL cholesterol (mmol/liter)			
Females	1.15 ± 0.25	1.14 ± 0.25	0.99
Males	1.04 ± 0.23	0.99 ± 0.27	0.26
LDL cholesterol (mmol/liter)	2.87 ± 0.98	2.78 ± 0.95	0.43
Triglycerides (mmol/liter)	1.83 (1.2; 2.58)	1.69 (1.21; 2.79)	0.57
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	266 (202; 321)	270 (200; 329)	0.84
CIMT (mm)	0.72 (0.64; 0.82)	0.72 (0.63; 0.80)	0.65
Liver fat content (mg triglycerides/g liver tissue)	99.6 (46.4; 163.4)	66.5 (25.9; 136.2)	0.04
Steatosis (liver fat content >55.6 mg triglycerides/g liver tissue)	76/108 (70.3%)	63/110 (57.2%)	0.04

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile range), unless described otherwise. GGT,  $\gamma$ -Glutamyl transferase.

Measurements of glucose or HbA1c did not correlate with CIMT.

CIMT correlated inversely with liver fat content in the subgroup of minor G allele carriers ( $r = -0.23$ ;  $P = 0.03$ ), but not in the subgroup of C allele homozygote carriers ( $r = 0.02$ ;  $P = 0.80$ ). In the subgroup of minor G allele carriers, patients with steatosis had a significantly lower CIMT (Table 3). In multivariate logistic regression, the relationship between the highest quartile of CIMT and steatosis was different according to adiponutrin polymorphism ( $P$  value for interaction = 0.008) (Table 5). Highest quartile of CIMT was positively and significantly associated with steatosis in C allele homozygote carriers (Table 5). At the opposite, the highest quartile of CIMT was inversely associated with steatosis in minor G allele carriers, but the trend was not significant (Table 5).

## Discussion

In this population of diabetics, we confirmed the influence of the PNPLA3 rs738409 polymorphism on hepatic triglyceride content, with significantly higher levels in carriers of the minor G allele in comparison to C allele homozygotes. An interesting finding of this study was that the relationship between metabolic factors and liver fat content was very different in each subgroup of the PNPLA3 rs738409 polymorphism. Indeed, in the C allele homozygote, liver fat content was closely linked to BMI and to the area of visceral fat measured by nuclear mag-

netic resonance. In contrast, in carriers of the minor G allele, we found no relationship between liver fat content and either BMI or the area of visceral fat. Moreover, we found an inverse correlation between CIMT and hepatic triglyceride content in univariate descriptive analysis. Our results showed for the first time that in type 2 diabetic patients, there are two different mechanisms of liver fat accumulation related to rs738409 adiponutrin polymorphism. The lack of a relationship with visceral obesity and the inverse correlation with CIMT suggest that fatty liver associated with the minor G allele of the PNPLA3 rs738409 polymorphism may not be linked to metabolic disorders in obese patients with type 2 diabetes.

Our data are in accordance with recently published studies that demonstrated in the general population that PNPLA3 rs738409 polymorphism is strongly associated with liver fat content independently of total and visceral adiposity and insulin resistance (3). Kantartzis *et al.* (3) suggested that adiponutrin may be an important key to understanding the mechanisms involved in the distinction between fatty liver with and fatty liver without metabolic consequences. These authors hypothesized that specifically PNPLA3-mediated accumulation of liver fat could be metabolically benign. Our result, showing a particular PNPLA3-mediated accumulation of liver fat in type 2 diabetic patients, is in agreement with the findings of Kantartzis *et al.* (3).

Few studies have evaluated the relationship between carotid atherosclerosis and liver fat content in diabetics,



**TABLE 3.** Clinical and metabolic characteristics of type 2 diabetic patients according to PNPLA3 rs738409 polymorphism and to the presence of steatosis

	Minor G allele carriers (GG/CG)		C allele homozygote (CC)		P
	Liver fat content <55.6 mg triglycerides/g liver tissue	Liver fat content >55.6 mg triglycerides/g liver tissue	Liver fat content <55.6 mg triglycerides/g liver tissue	Liver fat content >55.6 mg triglycerides/g liver tissue	
n	32	76	47	63	
Liver fat content (mg triglycerides/g liver tissue)	25.6 (17.7; 34.3)	142.1 (91.8; 208.0)	25.9 (16.6; 38.3)	125.5 (89.4; 214.1)	
Age (yr)	61.7 ± 10.5	61.1 ± 10.1	64.4 ± 9.6	60.3 ± 9.5	0.02
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	33.5 ± 7.0	34.2 ± 5.8	32.5 ± 6.3	35.8 ± 6.4	0.006
Duration of diabetes (yr)	16 (8; 23)	10.5 (3; 18)	13 (6; 20)	10 (3; 16)	0.15
HbA1c (%)	8.3 ± 1.5	8.4 ± 1.8	8.7 ± 2.2	8.6 ± 1.6	0.75
ASAT (U/liter)	19.2 ± 8.1	25.3 ± 13.0	19.9 ± 10.2	28.8 ± 21.7	0.01
ALAT (U/liter)	24.8 ± 9.9	41.3 ± 16.7	36.2 ± 46.5	44.5 ± 26.5	0.002
Triglycerides (mmol/liter)	1.27 (1.06; 2.09)	2.03 (1.37; 2.68)	1.54 (1.13; 2.21)	1.98 (1.37; 3.01)	0.02
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	242 (197; 308)	273 (209; 321)	228 (172; 285)	293 (218; 345)	0.002
CIMT (mm)	0.79 (0.65; 0.87)	0.71 (0.64; 0.79)	0.72 (0.62; 0.76)	0.74 (0.64; 0.85)	0.18

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile range), unless described otherwise.

**TABLE 4.** Independent factors associated with steatosis (multivariate logistic regression)

Covariates	OR	95% CI	P
Age	0.97	0.95; 1.03	0.79
BMI	0.98	0.89; 1.08	0.68
Diabetes duration	0.97	0.94; 1.01	0.20
ALAT	1.01	0.99; 1.02	0.25
HDL cholesterol	7.83	1.56; 39.07	0.01
LDL cholesterol	0.83	0.55; 1.27	0.40
Triglyceride level	1.62	1.13; 2.32	0.008
Subcutaneous fat area	0.99	0.996; 1.004	0.93
Sex			
Male	1		
Female	1.67	0.73; 3.80	0.21
Metformin			
No	1		
Yes	3.49	1.61; 7.57	0.002
Statin therapy			
No	1		
Yes	0.61	0.29; 1.31	0.21
Insulin therapy			
No	1		
Yes	0.82	0.34; 1.98	0.66
Adiponutrin C allele homozygote	1		
Adiponutrin minor G allele carriers	0.078	0.009; 0.695	0.02
Visceral fat area <sup>a</sup>			
Minor G carriers	1.004	0.997; 1.011	0.20
C homozygote carriers	1.010	1.004; 1.016	0.001

OR, Odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>a</sup> Marginally significant interaction between adiponutrin polymorphism and visceral fat area according to adiponutrin polymorphism (P value = 0.10).

and these had conflicting conclusions (9, 12, 13). Targher *et al.* (12) showed that liver fat content evaluated by patient history and liver ultrasound was associated with a higher prevalence of cardiovascular disease in people with type 2 diabetes. A limitation of this study was that the diagnosis of liver fat content was based on ultrasonography, a method that allows the detection of steatosis only when fat on liver biopsy exceeds 33%. In contrast, McKimmie *et al.* (13) demonstrated that liver fat content evaluated by computed tomography was not associated with CIMT in people with a high prevalence of type 2 diabetes (82%). In this study, the authors suggested that hepatic steatosis was less likely to be a direct mediator of subclinical cardiovascular disease and may instead be an epiphenomenon (7). In our study, we found that the relationship between CIMT and steatosis was different according to adiponutrin polymorphism. These new data could explain why in type 2 diabetic subjects, the different studies about the link between fatty liver and atherosclerosis give conflicting results (9, 12, 13).

Recently, Yamaguchi *et al.* (14) using a mouse model, showed that the accumulation of triglycerides may be a protective mechanism to prevent progressive liver damage

**TABLE 5.** Independent factors associated with highest quartile of CIMT (multivariate logistic regression)

Covariates	OR	95% CI	P
Age	1.02	0.97; 1.08	0.31
Sex			
Male	1		
Female	0.57	0.22; 1.50	0.26
BMI	1.007	0.91; 1.11	0.87
Diabetes duration	1.03	0.99; 1.07	0.12
ALAT	0.99	0.97; 1.01	0.46
HDL cholesterol	0.91	0.15; 5.42	0.91
LDL cholesterol	1.25	0.79; 1.98	0.33
Triglyceride level	0.98	0.75; 1.28	0.91
Systolic blood pressure	1.01	0.98; 1.03	0.35
Subcutaneous fat area	0.999	0.995; 1.004	0.95
Visceral fat area	0.999	0.994; 1.004	0.87
Current smoker			
No	1		
Yes	0.84	0.46; 1.52	0.58
Statin therapy			
No	1		
Yes	1.09	0.45; 2.65	0.83
Adiponutrin C allele homozygote	1		
Adiponutrin minor G allele carriers	0.14	0.03; 0.69	0.01
Minor G carriers			
Steatosis no	1		
Steatosis yes <sup>a</sup>	0.53	0.15; 1.83	0.32
C homozygote carriers			
Steatosis no	1		
Steatosis yes <sup>a</sup>	6.05	1.37; 26.9	0.01

OR, Odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>a</sup> Significant interaction between highest quartile of CIMT and steatosis according to adiponutrin polymorphism (*P* value for interaction = 0.007).

in NAFLD. Methionine and choline diets induce hepatic triglyceride accumulation by inhibiting mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids and blocking hepatic export of very low-density lipoprotein (14). The inhibition of triglyceride synthesis in methionine and choline mouse models of nonalcoholic steatohepatitis improved hepatic steatosis but exacerbated liver damage and fibrosis (14). Blocking triglyceride synthesis increased hepatic free fatty acid content and markers of lipid peroxidation and oxidative stress. These authors suggested that in such mice, triglyceride synthesis helped to protect hepatocytes from lipotoxicity by buffering the accumulation of free fatty acid (14). The reason why the association between liver fat content and carotid atherosclerosis varies as a function of PNPLA3 polymorphism is not yet known. Several studies in cardiac myocytes, pancreatic  $\beta$ -cells, and breast cancer cell lines suggest that lipotoxicity from the accumulation of long-chain fatty acids is specific to saturated fatty acids (15, 16). This selectivity has been attributed to the generation of specific proapoptotic lipid species or signaling molecules in response to saturated but not unsaturated fatty acids. The possibility that in carriers of the minor G PNPLA3-allele hepatic triglyceride synthesis could protect

other tissues from the potential lipotoxicity of free fatty acids needs to be evaluated (16). The mechanism by which variation in PNPLA3 affects liver triglyceride content is not well known. Adiponutrin has transacylase activity *in vitro* (17). Recently, it has been shown that the amino acid substitution in PNPLA3 that confers susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease (I148M) inhibits catalytic activity of the enzyme (18). He *et al.* (18) suggested that expression of the mutant adiponutrin promotes triglyceride accumulation by inhibiting triglyceride hydrolysis in the cell. This mechanism could be associated with decreased lipotoxicity. Further studies are needed to determine the influence of fatty liver associated or not associated with PNPLA3-minor allele polymorphism on liver fibrosis and metabolic complications secondary to diabetes mellitus.

Several limitations of the current study need to be considered. First, it is a cross-sectional study. Second, the number of patients was fairly small. We are aware that our results are not definitive and should be confirmed in larger cohorts. Third, <sup>1</sup>H-MR spectroscopy does not give histological findings. However, performing liver biopsies for research purposes in patients who are free of known liver disease raises ethical problems. Finally, the patients enrolled in this study might have had relatively severe cases of type 2 diabetes and might not be representative of standard diabetic patients, given that the diabetic conditions of patients who attended a tertiary care center were considered to be more serious than those of other diabetic patients.

In conclusion, this study suggests that in people with type 2 diabetes, liver fat content is related to PNPLA3 rs738409 polymorphism. Moreover, our study showed that in diabetic subjects, the relationship between metabolic factors and liver fat content was very different in minor G allele carriers and in C allele homozygotes of the PNPLA3 rs738409 polymorphism. The lack of a relationship with visceral obesity and the inverse correlation with CIMT suggest that fatty liver associated with the minor G allele of the PNPLA3 rs738409 polymorphism may not be linked to metabolic disorders.

## Acknowledgments

We thank Dr. C. Bonithon-Kopp of the Centre d'Investigation Clinique—Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Centre Hospitalier Universitaire de Dijon for assistance with this study and Philip Bastable for his help in reviewing the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. J. M. Petit, Service de Diabétologie et d'Endocrinologie, Centre

Hospitaire Universitaire du Bocage, BP 77908, 21079 Dijon cedex, France. E-mail: jean-michel.petit@chu-dijon.fr.

This work was supported by the Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (AOI 2010) and by the ALFEDIAM.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- Cusi K 2009 Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16:141–149
- Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH 2008 Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40:1461–1465
- Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N 2009 Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* 58:2616–2623
- Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P, Krause D, Cercueil JP 2009 Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 250:95–102
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH 2004 Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40:1387–1395
- Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, Lundbom N, Rissanen A, Ridderstråle M, Groop L, Orho-Melander M, Yki-Järvinen H 2009 Prediction of nonalcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 137:865–872
- Szczepaniak LS, Nuremberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL 2005 Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E462–E468
- Ross R, Léger L, Morris D, de Guise J, Guardo R 1992 Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. *J Appl Physiol* 72:787–795
- Petit JM, Guiu B, Terriat B, Loffroy R, Robin I, Petit V, Bouillet B, Brindisi MC, Duvillard L, Hillon P, Cercueil JP, Verges B 2009 Non-alcoholic fatty liver is not associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4103–4106
- Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ 2009 A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 50:2111–2116
- Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orho-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H 2009 A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 52:1056–1060
- Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G 2007 Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30:2119–2121
- McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, Bowden DW, Freedman BI, Register TC, Hsu FC, Lohman KK, Weinberg RB, Wagenknecht LE 2008 Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Am J Gastroenterol* 103:3029–3035
- Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM 2007 Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45:1366–1374
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese Jr RV, Ory DS, Schaffer JE 2003 Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3077–3082
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I 2007 Good fat/bad fat. *Hepatology* 45:1343–1346
- Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, Revett T, Shih HH, Liu W, Paulsen JE, Gimeno RE 2005 Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of adiponutrin family members. *J Lipid Res* 46:2477–2487
- He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH 2010 A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285:6706–6715

## ANNEXE I

### **Publication n°9**

**Loffroy R, Guiu B, Terriat B, Jooste V, Robin I, Petit V, Bousset L,  
Brindisi MC, Buffier P, Douek P, Hillon P, Verges B, Cercueil JP,  
Petit JM.**

**Liver Fat Content is Negatively Associated with Atherosclerotic Carotid  
Plaque in Type 2 Diabetic Patients.**

***Diabet Med* 2010; Under Review.**



## Liver Fat Content is Negatively Associated with Atherosclerotic Carotid Plaque in Type 2 Diabetic Patients

Journal:	<i>Diabetic Medicine</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Loffroy, Romaric; LRMN Creatis, UMR CNRS 5515, Inserm U630, Claude Bernard University, Department of Radiology, Lyon, France</p> <p>Guiu, Boris; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Radiology, Dijon, France</p> <p>Terriat, Beatrice; Bocage Teaching Hospital, Department of Angiology, Dijon, France</p> <p>Jooste, Valerie; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Dijon, France</p> <p>Robin, Isabelle; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Dijon, France</p> <p>Petit, Vincent; Bocage Teaching Hospital, Department of Angiology, Dijon, France</p> <p>Boussel, Loic; LRMN Creatis, UMR CNRS 5515, Inserm U630, Claude Bernard University, Department of Radiology, Lyon, France</p> <p>Brindisi, Marie Claude; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Dijon, France</p> <p>Buffier, Perrine; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Dijon, France</p> <p>Douek, Philippe; LRMN Creatis, UMR CNRS 5515, Inserm U630, Claude Bernard University, Department of Radiology, Lyon, France</p> <p>Hillon, Patrick; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Hepatology, Dijon, France</p> <p>Verges, Bruno; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Dijon, France</p> <p>Cercueil, Jean Pierre; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Radiology, Dijon, France</p> <p>Petit, Jean Michel; Inserm U866, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology, Dijon, France</p>
Keywords:	atherosclerosis, carotid ultrasound, type 2 diabetes, magnetic resonance imaging, non-alcoholic steatohepatitis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Peer Review

1  
2  
3 **TITLE PAGE**  
4  
5  
6  
7

8 **Manuscript Title**  
9

10 Liver Fat Content is Negatively Associated with Atherosclerotic Carotid Plaque in Type 2  
11 Diabetic Patients  
12  
13  
14  
15  
16

17 **Running Title**  
18

19 Liver Fat Content and Carotid Atherosclerosis  
20  
21  
22  
23

24 **Authors and Affiliations**  
25

26 R Loffroy,<sup>(1,2,3)</sup> B Guiu,<sup>(3,4)</sup> B Terriat,<sup>(5)</sup> V Jooste,<sup>(4)</sup> I Robin,<sup>(4)</sup> V Petit,<sup>(5)</sup> L Boussel,<sup>(2)</sup> MC  
27 Brindisi,<sup>(4,6)</sup> P Buffier,<sup>(4,6)</sup> P Douek,<sup>(2)</sup> P Hillon,<sup>(4,7)</sup> B Vergès,<sup>(4,6)</sup> JP Cercueil,<sup>(3,4)</sup> JM Petit,<sup>(4,6)</sup>  
28  
29 for the GEPSAD Study Group  
30  
31  
32

- 33  
34 (1) The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science, Division  
35 of Cardiovascular and Interventional Radiology, The Johns Hopkins Medical  
36 Institutions, Baltimore, Maryland, USA  
37  
38  
39  
40  
41 (2) LRMN Creatis, UMR CNRS 5515, Inserm U630, Claude Bernard University, Lyon,  
42 France  
43  
44  
45  
46 (3) Department of Radiology, University of Dijon School of Medicine, Bocage Teaching  
47 Hospital, Dijon, France  
48  
49  
50  
51 (4) Inserm U866, Faculty of Medicine, University of Burgundy, Dijon, France  
52  
53  
54 (5) Department of Angiology, University of Dijon School of Medicine, Bocage Teaching  
55 Hospital, Dijon, France  
56  
57  
58 (6) Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, University of Dijon School of  
59 Medicine, Bocage Teaching Hospital, Dijon, France  
60

1  
2  
3 (7) Department of Hepatology, University of Dijon School of Medicine, Bocage Teaching  
4  
5 Hospital, Dijon, France  
6  
7  
8  
9

### 10 **Corresponding Author**

11  
12  
13 Romaric Loffroy, MD

14  
15  
16 Professional address: The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological  
17  
18 Science, Division of Cardiovascular and Interventional Radiology, The Johns Hopkins  
19  
20 Medical Institutions, 600 North Wolfe Street, Blalock 545, Baltimore, MD 21287, USA

21  
22  
23 Tel: (001)-410-955-6081

24  
25  
26 Fax: (001)-410-955-0233

27  
28  
29 E-mail: romaric.loffroy@gmail.com  
30  
31  
32

### 33 **Word Count**

34  
35 Abstract: 239 words

36  
37 Article: 2138 words (not including references), 2995 words (including references)  
38  
39  
40  
41

### 42 **Acknowledgments**

43  
44 The authors are deeply grateful to Prof. Bonithon-Kopp from the Clinical Investigation Center  
45  
46 of the University Hospital Center of Dijon, France, for assistance with this study  
47  
48  
49  
50

### 51 **Funding**

52  
53 This study was supported by a grant from the University Hospital Center of Dijon (PHRC  
54  
55 2007)  
56  
57  
58  
59  
60



**ABSTRACT**

AIMS: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is independently associated with atherosclerosis in nondiabetic individuals. In type 2 diabetic patients, the link between fatty liver and atherosclerosis is less clear. Here, we assessed whether liver fat content evaluated using  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) was independently associated with prevalent carotid plaque as a marker of atherosclerosis in type 2 diabetic patients.

METHODS: 144 prospectively enrolled patients with type 2 diabetes underwent liver fat content measurement using  $^1\text{H}$ -MRS and carotid plaque assessment using ultrasound.

Multiple logistic regression was used to identify factors associated with carotid plaque.

RESULTS: Mean  $\pm$  SD liver fat content was  $9.86 \pm 8.12\%$ . Carotid plaque prevalence was 52.1% (75/144). Patients without plaque were younger ( $P=0.006$ ) and had a smaller visceral fat area ( $P=0.015$ ), lower reported prevalence of previous cardiovascular events or current statin therapy ( $P=0.002$ ), and higher liver fat content than those with plaque ( $P=0.009$ ). By multivariable logistic regression, increased liver fat content independently predicted the absence of carotid plaque (odds ratio, 0.94; 95% confidence interval, 0.89-0.99;  $P=0.017$ ).

CONCLUSIONS: Liver fat content measured by  $^1\text{H}$ -MRS is higher in type 2 diabetic patients without carotid plaque compared to those with plaque. This study suggests that increased liver fat content could be associated with a relative protection against carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. Longitudinal studies are necessary to determine whether liver fat content in type 2 diabetic patients is associated with long-term cardiovascular morbidity and mortality.

**KEYWORDS**

Hepatic steatosis; Nonalcoholic fatty liver disease; Type 2 diabetes; Atherosclerosis; Carotid plaque.

**ABBREVIATIONS**

c-IMT: carotid artery intima-media thickness

<sup>1</sup>H-MRS: <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy

IMT: intima-media thickness

jMRUI: Java-based MR user interface spectroscopic analysis package

NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease

## INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently the most common cause of chronic liver disease among adults in Western countries (1,2). The spectrum of NAFLD ranges from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which can progress to end-stage liver disease. NAFLD is commonly associated with obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes (1-3). In the last few years, several studies assessed the association between hepatic steatosis and carotid atherosclerosis. Their results suggest that NAFLD in nondiabetic individuals may be associated with an increased cardiovascular risk and, in particular, with an increased prevalence of carotid lesions (4-9). In patients with type 2 diabetes, the link between fatty liver and atherosclerosis is more controversial, as studies have produced conflicting results (10-14). Reasons for the discrepancies across studies may include the lack of standardization of measurement methods and the detection of hepatic steatosis using ultrasound, which allows only a qualitative assessment of liver fat content (15).

Here, our objective was to assess whether liver fat content was associated with prevalent carotid plaque in patients with type 2 diabetes. We quantitated liver fat content using  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS), a highly accurate imaging technique. We planned to evaluate whether any link between liver fat content and carotid plaque was independent from conventional cardiovascular risk factors.

## PATIENTS AND METHODS

### Study Population

The GEPSAD (GEnetic Polymorphisms, Steatosis And Diabetes) study is a prospective single-center study conducted in 144 consecutive type 2 diabetic patients (74 men; 70 women; mean age  $60.4 \pm 10.3$  years; range, 36-84 years) recruited prospectively at an endocrinology department between February 2008 and August 2009. Inclusion criteria were type 2 diabetes for at least 2 years; age 18 years or older; body weight no greater than 150 kg; no history of acute or chronic disease based on the history, physical examination, blood cell counts, and electrolyte concentrations; alcohol consumption less than 20 grams per day; and no evidence of liver disease such as viral hepatitis. Patients were not eligible if they had causes of liver steatosis (alcohol use  $\geq 20$  g/day, hepatitis B or C virus infection, or use of drugs known to precipitate steatosis [thiazolidinediones, corticosteroids, and immunosuppressants]) or contraindications to magnetic resonance imaging (pacemaker, metallic implants, claustrophobia, or body weight greater than 150 kg). Patient characteristics are reported in Table 1. The study protocol was approved by our local research ethics committee and all patients gave written informed consent before study inclusion.

### Measurements

#### *Clinical Characteristics*

Sociodemographic characteristics and medical histories were assessed by computer-aided face-to-face interview. Diabetes was diagnosed according to American Diabetes Association criteria (symptoms of diabetes and casual plasma glucose level greater than or equal to 11.1 mmol/L or fasting plasma glucose level greater than or equal to 7.0 mmol/L) (16). Mean daily alcohol consumption was calculated using beverage-specific percentages of

1  
2  
3 pure ethanol by volume. Smokers were defined as former or current smokers. Systolic and  
4  
5 diastolic blood pressures were measured and arterial hypertension defined as mean systolic  
6  
7 blood pressure  $\geq 140$  mm Hg, mean diastolic blood pressure  $\geq 90$  mm Hg, or self-reported use  
8  
9 of antihypertensive medication. We recorded previous cardiovascular events (myocardial  
10  
11 infarction, angina, coronary revascularization, ischemic stroke, and symptomatic peripheral  
12  
13 arterial disease).  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 *Laboratory tests*

21  
22 Plasma glucose, fasting serum low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, plasma liver  
23  
24 enzymes, and markers for hepatitis B virus (HbsAg) and hepatitis C virus (anti-HCV)  
25  
26 infections were determined using standard laboratory procedures.  
27  
28  
29  
30

### 31 *<sup>1</sup>H-Magnetic Resonance Spectroscopy*

32  
33  
34 Liver fat content was measured using a 3.0-Tesla Magnetom Trio A TIM whole-body  
35  
36 system (Siemens, Erlangen, Germany) as previously described (17). Briefly, sagittal, coronal,  
37  
38 and axial slices through the right lobe of the liver were acquired, and a 27-cm<sup>3</sup> spectroscopic  
39  
40 volume of interest was positioned on segment VII. To measure T2 relaxation times of water  
41  
42 and methylene, single-voxel <sup>1</sup>H-MRS data were acquired using seven breath-hold PRESS  
43  
44 sequences (repetition time, 5000 msec; 3 acquisitions; and 2048 data points over 1250 Hz  
45  
46 spectral width) with echo times of 30, 40, 50, 60, 80, 100, and 135 msec. For each of the two  
47  
48 voxel placements, automated optimization of gradient shimming followed by manual  
49  
50 adjustment of central frequency was performed, and water line widths of 40–50 Hz were  
51  
52 obtained.  
53  
54  
55  
56

57  
58 The Java-based MR user interface spectroscopic analysis package (jMRUI) was used  
59  
60 for the time-domain analysis. Metabolite signals were analyzed using the Advanced Magnetic

1  
2  
3 Resonance (AMARES) fitting algorithm within jMRUI, which enables the inclusion of a large  
4 amount of prior knowledge. We measured the water peak at 4.7 ppm and the methylene peak  
5 at 1.3 ppm. Spectra were used only if homogeneity after shimming was better than 0.45 ppm,  
6 measured as the full width at 50% peak height. Peak integrals were quantified by fitting to a  
7 Gaussian line shape. Finally, liver fat content was calculated as previously reported (17).  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Hepatic steatosis was defined as a hepatic triglyceride content greater than 5.5% (2).

### *Visceral Fat Measurement*

Visceral fat was measured using a single-slice axial T1-weighted image at the level of the L4-L5 intervertebral disc. Images were analyzed for cross-sectional area of visceral fat (18).

### *Carotid Ultrasound*

Carotid plaque assessment and intima-media thickness (IMT) measurement were performed by a single experienced sonographer who was blind to all clinical and laboratory data. High-resolution real-time B-mode ultrasound scanning of the extracranial carotid arteries was performed using a 7.5-MHz linear transducer (Philips HD 11, Best, The Netherlands), with the patient lying supine. Longitudinal projections of both carotid arteries were examined.

Carotid IMT (c-IMT) was measured off-line using specially designed software (Philips Qlab 6.0) at the level of the common carotid artery far wall, in the 15-mm segment proximal to the carotid bulb and in plaque-free segments, as previously described (19,20), as the distance between the leading edges of the lumen-intima (first echogenic line) and media-adventitia (second echogenic line) interfaces. The mean of three measurements at each artery was used for the analysis.

1  
2  
3 Plaque was defined as focal widening of the vessel wall relative to adjacent segments  
4  
5 (with protrusion into the lumen and/or localized roughness with increased echogenicity and/or  
6  
7 focal IMT  $\geq$  1.2 mm) (5). Plaque was considered present when one or more plaques were seen  
8  
9 in any of 12 carotid segments (near and far walls of the right and left common carotid arteries,  
10  
11 bifurcation, and internal and external carotid arteries) (6,21).  
12  
13  
14  
15  
16

### 17 **Statistical Analysis**

18  
19 The patients were divided into two groups based on presence or absence of carotid  
20  
21 plaque. We investigated whether presence of carotid plaque was associated with any of the  
22  
23 following variables: age, sex, visceral fat area, diabetes duration, smoking, hypertension,  
24  
25 previous cardiovascular events or current statin therapy, LDL-cholesterol, and liver fat  
26  
27 content. Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD and compared using the Student  
28  
29 test, whereas categorical variables were expressed as number (percentage) and compared  
30  
31 between groups using the chi-square test. All variables were included in a multivariate logistic  
32  
33 regression model to identify factors independently associated with carotid plaque. The odds  
34  
35 ratios (ORs) were calculated, with the model-based lower and upper 95% confidence intervals  
36  
37 (95% CIs). *P* values smaller than 0.05 were considered statistically significant. All statistical  
38  
39 analyses were performed using Stata 11 software (StataCorp 2009, Stata Statistical Software,  
40  
41 Release 11, College Station, TX).  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

Table 1 reports the main features in the 144 patients at study inclusion. No patients had positive HIV serology, inflammatory bowel disease, or current parenteral nutrition. Previous cardiovascular events or current statin therapy was noted in 84 (58.3%) patients. Mean  $\pm$  SD liver fat content was  $9.86 \pm 8.12\%$ , ranging from 0.03% to 30.45%. Carotid plaque was found in 75 (52.1%) patients.

The main characteristics of patients with and without carotid plaque are reported in Table 2. Patients with carotid plaque were older and had a higher visceral fat area values and a higher reported prevalence of previous cardiovascular events or current statin therapy. Liver fat content was significantly higher in patients without plaque than in those with plaque in the univariate analysis ( $P=0.009$ ). No differences between the two groups were found for sex distribution, diabetes duration, prevalence of smoking, prevalence of hypertension, or LDL-cholesterol levels (Table 2).

In the multivariable analysis, age, visceral fat area, and prevalence of previous cardiovascular events or current statin therapy were positively associated with the presence of plaque. In contrast, liver fat content was negatively associated with presence of plaque (OR, 0.94; 95% CI, 0.89-0.99;  $P=0.017$ ). Presence of plaque was not predicted by sex, diabetes duration, smoking, hypertension, or LDL-cholesterol levels (Table 3).



## DISCUSSION

The main finding from this study is that a higher fat liver fat content, as assessed using <sup>1</sup>H-MRS, was strongly associated with absence of carotid plaque, independently from conventional cardiovascular risk factors, in patients with type 2 diabetes mellitus. To our knowledge, this is the first cross-sectional study demonstrating an independent relationship between the amount of liver fat and a decreased risk of carotid atherosclerosis in a population of type 2 diabetic patients.

Whether liver fat content is an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality is an important issue. Liver steatosis is now considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome (22). Recent data indicate that the severity of NAFLD is associated with higher c-IMT values (7), higher carotid plaque prevalence (6,21), and lower endothelial flow-mediated vasodilation (23), independently from the underlying metabolic abnormalities. Furthermore, in nondiabetic individuals, NAFLD is associated with higher all-cause mortality (24,25) and higher prevalence (4,6) and incidence (25) of cardiovascular disease. Several studies consistently demonstrated a link between hepatic steatosis and a pro-atherogenic pro-inflammatory biomarker profile (low HDL, high triglycerides, high C-reactive protein, and low adiponectin) (12). However, nearly all the studies showing independent associations between fatty liver and atherosclerosis were done in nondiabetic individuals and involved no adequate evaluation of visceral fat or insulin sensitivity (13). Furthermore, liver fat was generally assessed using ultrasonography, which has two technical limitations. First, ultrasonography detects steatosis only when the amount of fat by liver biopsy is greater than 33% (15,26). Second, ultrasonography allows qualitative scoring of steatosis severity but does not provide quantitative measurements (27).

1  
2  
3 In patients with type 2 diabetes, the relationship between carotid atherosclerosis and  
4 fatty liver is unclear. Conflicting results were obtained from the only two studies investigating  
5 whether hepatic steatosis in type 2 diabetic patients was independently associated with  
6 cardiovascular disease, defined as cerebrovascular event prevalence (11) or increased c-IMT  
7 (12). Targher et al. (11) found that patients with NAFLD had a considerably higher  
8 prevalence of cerebrovascular disease compared to patients without NAFLD (20.0% vs.  
9 13.3%,  $P < 0.001$ ). The main limitation of this study is that NAFLD was diagnosed using  
10 ultrasonography. In contrast, Mc Kimmie et al. (12) found no significant association between  
11 hepatic steatosis evaluated by computed tomography and c-IMT or carotid calcium deposition  
12 and concluded that hepatic steatosis was probably not a direct mediator of cardiovascular  
13 disease. In our study, we evaluated liver fat content using  $^1\text{H-MR}$  spectroscopy, which is  
14 considered the most accurate noninvasive method (17,26). Contrary to previous studies, we  
15 found that liver fat content was negatively associated with the presence of carotid plaque. The  
16  $^1\text{H-MRS}$  method measures the percentage of fat in the liver and, unlike other noninvasive  
17 methods such as ultrasonography or computed tomography, provides highly accurate  
18 quantitative measurements of the amount of liver fat, allowing grading of disease severity  
19 (17).

20  
21  
22 Our study has several limitations. First, the data from our study do not provide an  
23 explanation for the negative correlation between liver fat and carotid plaque. Furthermore, the  
24 cross-sectional design does not allow us to determine whether liver fat and absence of carotid  
25 plaque were causally related. Second, c-IMT is only a marker for atherosclerosis and not  
26 atherosclerosis itself. The mechanisms and disorders that cause carotid wall hypertrophy may  
27 increase c-IMT without increasing the risk of clinical atherosclerotic events. However, a  
28 strong positive association has been reported between carotid plaque prevalence and stroke  
29 (28). Third, the reference standard for evaluating hepatic steatosis is liver biopsy. However,  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 liver biopsy was not ethically acceptable in our population, and <sup>1</sup>H-MRS is highly accurate  
4  
5 (17). Fourth, we included only patients with type 2 diabetes. The distribution of many pro-  
6  
7 atherogenic variables differs between type 2 diabetic patients and the general population. We  
8  
9 do not know whether our findings apply to other populations. However, type 2 diabetic  
10  
11 patients are of special concern, as they are at high risk for metabolic syndrome and subclinical  
12  
13 cardiovascular disease. Despite this high risk, we found that higher liver fat content was  
14  
15 associated with absence of carotid plaque.  
16  
17  
18  
19  
20  
21

22 In conclusion, in our study the severity of hepatic steatosis was strongly associated  
23  
24 with the absence of carotid plaque in type 2 diabetic patients, independently from  
25  
26 conventional cardiovascular risk factors and metabolic syndrome components. These findings  
27  
28 suggest that increased liver fat content may be associated with relative protection against  
29  
30 carotid atherosclerosis and with a decreased risk of future cardiovascular events in patients  
31  
32 with type 2 diabetes. Longitudinal studies are needed to assess this hypothesis and to elucidate  
33  
34 the molecular mechanisms linking liver steatosis and cardiovascular disease.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**DECLARATION OF COMPETING INTERESTS**

Nothing to declare.

For Peer Review

## REFERENCES

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1221-1231.
2. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; **40**: 1387-1395.
3. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; **2**: 262-265.
4. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men: role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care* 2004; **27**: 2498-2500.
5. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1045-1050.
6. Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J et al. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 1848-1853.
7. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1325-1330.
8. Sookoian S, Pirola CJ. Nonalcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008; **49**: 600-607.

- 1  
2  
3 9. Kim HC, Kim DJ, Huh KB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and  
4  
5 carotid intima-media thickness according to the presence of metabolic syndrome.  
6  
7  
8 Atherosclerosis 2009; **204**: 521-525.  
9
- 10 10. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Poli F, Scala L, Zenari et al. Nonalcoholic fatty  
11  
12 liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2  
13  
14 diabetic patients. J Endocrinol Invest 2006; **29**: 55-60.  
15  
16
- 17 11. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G et al. Nonalcoholic fatty  
18  
19 liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular  
20  
21 events in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2007; **30**: 2119-2121.  
22  
23
- 24 12. McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, Bowden DW, Freedman BI, Register TC et al.  
25  
26 Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2  
27  
28 diabetes: the Diabetes Heart Study. Am J Gastroenterol 2008; **103**: 3029-3035.  
29  
30
- 31 13. Picardi A, Vespasiani-Gentilucci U. Association between nonalcoholic fatty liver  
32  
33 disease and cardiovascular disease: a first message should pass. Am J Gastroenterol  
34  
35 2008; **103**: 3036-3038.  
36  
37
- 38 14. Petit JM, Guiu B, Terriat B, Loffroy R, Robin I, Petit V et al. Nonalcoholic fatty liver  
39  
40 is not associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetic patients. J Clin  
41  
42 Endocrinol Metab 2009; **94**: 4103-4106.  
43  
44
- 45 15. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic  
46  
47 fatty liver disease. Clin Liver Dis 2004; **8**: 521-533.  
48  
49
- 50 16. The American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus.  
51  
52 Diabetes Care 2004; **27**(Suppl 1): S5-10.  
53  
54
- 55 17. Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D et al. Quantification of  
56  
57 liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and  
58  
59 in vivo proton MR spectroscopy. Radiology 2009; **250**: 95-102.  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
18. Ross R, Léger L, Morris D, de Guise J, Guardo R. Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. *J Appl Physiol* 1992; **72**: 787-795.
  19. Touboul PJ, Prati P, Scarabin PY, Adrai V, Thibout E, Ducimetière P. Use of monitoring software to improve the measurement of carotid wall thickness by B-mode imaging. *J Hypertens Suppl* 1992; **10**: S37-41.
  20. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis* 2007; **23**: 75-80.
  21. Ramilli S, Pretolani S, Muscari A, Pacelli B, Arienti V. Carotid lesions in outpatients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 4770-4774.
  22. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 27-38.
  23. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; **42**: 473-478.
  24. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; **129**: 113-121.
  25. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; **44**: 865-873.
  26. Mazhar SM, Shieh-morteza M, Sirlin CB. Noninvasive assessment of hepatic steatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; **7**: 135-140.

- 1  
2  
3 27. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M et al. The utility  
4 of radiological imaging in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;  
5  
6 **123**: 745-750.  
7  
8  
9  
10 28. Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, Walker M, Nicolaides AN et  
11 al. Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent  
12 cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart study. *Stroke*  
13  
14 1999; **30**: 841-850.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review



**TABLE 1.****Main characteristics of the 144 study patients.**

<b>Variable</b>	<b>Value</b>
Age (years)	60.4 ± 10.3
Male sex	74 (51.4)
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	268 ± 96.4
Duration of diabetes (years)	13.7 ± 10.4
Smoking	80 (55.6)
Hypertension	32 (22.2)
Previous cardiovascular event or current statin therapy	84 (58.3)
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.83 ± 0.96
Liver fat content (%)	9.86 ± 8.12
Carotid plaque	75 (52.1)

*Footnote:*Data are mean ± SD or *n* (%).

LDL, low-density lipoprotein.

**TABLE 2.****Main characteristics of the patients with and without carotid plaque.**

<b>Variable</b>	<b>No plaque (n = 69)</b>	<b>Plaque (n = 75)</b>	<b>P value</b>
Age (years)	57.8 ± 9.98	62.7 ± 10.07	0.006
Male sex	31 (44.9)	43 (57.3)	0.137
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	247.1 ± 88.7	287.3 ± 99.7	0.015
Duration of diabetes (years)	13.7 ± 10.5	13.6 ± 10.3	0.974
Smoking	35 (50.7)	45 (60)	0.263
Arterial hypertension	15 (21.7)	17 (22.7)	0.894
Previous cardiovascular event or current statin therapy	31 (44.9)	53 (70.7)	0.002
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.85 ± 0.80	2.81 ± 1.09	0.759
Liver fat content (%)	11.75 ± 8.78	8.12 ± 7.09	0.009

*Footnote:*Data are mean ± SD or *n* (%).*P* < 0.05 was considered statistically significant.

LDL, low-density lipoprotein.

**TABLE 3.**

**Multivariable logistic regression analysis to identify factors associated with carotid plaque.**

<b>Variable</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>95% CI</b>	<b>P value</b>
Age (years)*	1.05	1.01-1.09	0.026
Male sex	0.75	0.32-1.74	0.502
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )*	1.01	1.00-1.01	0.017
Duration of diabetes (years)*	0.97	0.93-1.01	0.180
Smoking	1.18	0.50-2.79	0.702
Hypertension	0.82	0.32-2.09	0.673
Previous cardiovascular event or current statin therapy	2.47	1.06-5.73	0.036
LDL-cholesterol (mmol/L)*	1.26	0.82-1.94	0.289
Liver fat content (%)*	0.94	0.89-0.99	0.017

*Footnote:*

\* Odds ratio for continuous variables were computed for an increase by one unit.

$P < 0.05$  was considered statistically significant.

CI, confidence interval; LDL, low-density lipoprotein.