



Etudes biologiques et cliniques du 6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose : Traceur du transport du glucose marqué à l'iode 123 et marqueur de l'insulinorésistance chez l'homme

Gilles Barone-Rochette

► To cite this version:

Gilles Barone-Rochette. Etudes biologiques et cliniques du 6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose : Traceur du transport du glucose marqué à l'iode 123 et marqueur de l'insulinorésistance chez l'homme. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. ⟨NNT : 2013GRENS030⟩. ⟨tel-01061824⟩

HAL Id: tel-01061824

<https://theses.hal.science/tel-01061824v1>

Submitted on 8 Sep 2014

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

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

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Gilles BARONE-ROCHETTE

Thèse dirigée par **Gérald VANZETTO** et
codirigée par **Catherine GHEZZI**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques
Biocliniques – INSERM U1039**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et
l'Environnement**

**Développement d'une technique rapide de
mesure de l'insulinorésistance chez
l'homme avec un traceur du transport du
glucose marqué à l'iode 123 : le 6-déoxy-6-
iodo-D-glucose (6-DIG).**

Thèse soutenue publiquement le **24 septembre 2013**
devant le jury composé de :

M. Gérald VANZETTO

PU-PH, UJF, Grenoble, Directeur de thèse

Mme, Catherine GHEZZI

Professeur à l'UJF, Grenoble, Co-Directeur de thèse

M. François BOUCHER

Professeur à l'UJF, Grenoble, Examineur

Mme, Frédéric FROUIN

Chargé de Recherches, U678, Paris, Examineur

M. Jean Eric WOLF

PU-PH, Université de Bourgogne, Rapporteur

M. Patrick BOURGUET

PU-PH, Université de Rennes, Rapporteur



*À ma mère et ma famille pour leur soutien toujours sans faille,
A ma fille Juliette, pour le bonheur qu'elle m'apporte par son existence*

*Aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail
A tous ceux qui ont su m'écouter un jour pour leur soutien dans les moments difficiles ...*

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES	8
LISTES DES TABLEAUX	12
LISTES DES ABRÉVIATIONS FRÉQUEMMENT UTILISÉES	13
Introduction générale	14
Pourquoi développer une nouvelle méthode de mesure de l'insulinorésistance ?	19
1. L'insulinorésistance :	20
2. INSULINORESISTANCE ET COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES	21
4. METHODES D'ÉVALUATION DE L'INSULINO-RESISTANCE IN VIVO :	26
3.1. <i>Les méthodes directes de mesure</i>	27
3.1.1 Le clamp euglycémique hyperinsulinémique.....	27
3.1.2. Le test de suppression insulinique	29
3.2. <i>Les méthodes indirectes de mesure</i>	29
3.2.1. Analyse par "Minimal Model" (MINMOD).....	29
3.2.2. Test de tolérance au glucose par voie orale ("Oral Glucose Tolerance Test", OGTT) et index dérivés.....	30
3.3. <i>Méthodes simples : Index basés sur les concentrations à jeun d'insuline et de glucose</i>	31
3.3.1. "HOMeostasis Model Assessment" (HOMA).....	31
3.3.2. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index" (QUICKI).....	32
3.4. <i>Méthodes de mesure de l'insulinorésistance par organe in vivo</i>	32
3.4.1. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (SRMN).....	32
3.4.2. La technique de dilution des multiples traceurs	33
3.4.3. La tomographie par émission de positons (TEP).....	34
5. CONCLUSION ET INTERET DE LA MESURE DE L'INSULINO-RESISTANCE :	36
Etudes pré-cliniques réalisées avec	38
le 6-DIG	38
1. INTRODUCTION	39
2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES, BIOLOGIQUES ET FORMULATION.....	39
2.1 <i>LA PURETE CHIMIQUE ET RADIOCHIMIQUE</i>	40
2.2 <i>ANALYSE DE LA TOXICITE POTENTIELLE DES CONSTITUANTS</i>	40
2.3 <i>IMPURETE DE SYNTHÈSE</i>	40
2.4 <i>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</i>	41
3. PHARMACOLOGIE NON CLINIQUE	41
3.1 <i>Pharmacologie primaire</i>	41
3.2 <i>Pharmacologie secondaire</i>	63
3.3 <i>Pharmacologie d'innocuité</i>	63
3.4 <i>Interactions pharmacodynamiques</i>	63
3.5 <i>Discussion et conclusion</i>	64
4. PHARMACOCINETIQUE CHEZ L'ANIMAL	64
4.1 <i>Objectif</i>	64
4.2 <i>Absorption</i>	64
4.3 <i>Distribution</i>	65
4.4 <i>Métabolisme</i>	66
4.5 <i>Excrétion</i>	66
4.6 <i>Interactions de type pharmacocinétique</i>	66
4.7 <i>Autres études pharmacocinétiques</i>	66
4.8 <i>Discussion et conclusion</i>	66
5. TOXICITE	67
5.1 <i>Toxicité par administration unique</i>	67
5.2 <i>Toxicité par administration répétée</i>	68
5.3 <i>Carcinogénicité</i>	68
5.4 <i>Tolérance locale, telle qu'irritation et sensibilisation</i>	69
5.5 <i>Toxicité de la reproduction et du développement</i>	69
5.6 <i>Génotoxicité in vitro et in vivo</i>	69
Méthode d'incorporation sur plaque:	69

Méthode par pré-incubation:.....	70
Etude clinique	71
Phase 1/2a	71
1. JUSTIFICATION DE L'ESSAI – PREREQUIS.....	72
2. PROTECTION DES PERSONNES.....	73
2.1 Justification éthique du protocole.....	73
2.2 Dispositions éthiques et réglementaires.....	73
2.3 Comité pour la Protection des Personnes (CPP).....	74
2.4 Assurance et financement.....	74
2.5 Modalités de recueil du consentement des personnes.....	74
2.6 Inscription des sujets sur le fichier national des personnes se prêtant à une recherche biomédicale et période d'exclusion.....	76
2.7 Indemnisation des sujets participant à l'étude.....	76
3. OBJECTIFS	77
3.1 OBJECTIF PRINCIPAL.....	77
4. PLAN EXPERIMENTAL.....	77
4.1 Type d'essai.....	77
4.3 Exposé du plan expérimental.....	77
5. CRITERES D'EVALUATION.....	78
5.1 Critères de tolérance :.....	78
5.2 Critères de faisabilité :.....	78
5.3 Critères de reproductibilité :.....	78
5.4 Critères pharmacocinétiques :.....	78
5.5 Critères d'efficacité et technique(s) de mesure.....	78
5.6 Critères de contrôle de la compliance.....	79
6. SELECTION DES PERSONNES.....	79
6.1 Population étudiée participante.....	79
6.1.1 Description des personnes participantes.....	79
6.1.2 Durée de la participation des personnes à la recherche.....	80
6.1.3 Description du nombre de personnes à inclure et des différents groupes de participants.....	80
6.2 Recrutement et sortie de l'essai.....	80
6.2.1 Mode de recrutement.....	80
6.2.2 Description des critères d'inclusion.....	81
6.2.3 Description des critères de non inclusion ou d'exclusion.....	82
6.2.4 Conditions de sortie d'essai.....	84
6.2.5 Modalités à mettre en place en fin de participation à l'essai.....	85
6.2.6 Modalités à mettre en place en cas de sortie de l'essai.....	85
6.2.7 Modalités à mettre en place en cas de découverte de résultats significatifs concernant la santé de la personne.....	85
7. REALISATION PRATIQUE DU PROTOCOLE.....	85
7.1 Description détaillée des actes pratiqués sur les personnes.....	85
7.1.1 Schéma expérimental :.....	85
7.1.2 Déroulement pratique de l'étude:.....	86
8 ADMINISTRATION DE PRODUITS.....	103
8.1 6-DIG.....	103
8.1.1 Posologie et conditions d'administration.....	103
8.1.2 Mode d'administration.....	104
8.1.3 Présentation des produits.....	104
8.1.4 Circuit pharmaceutique.....	105
8.1.5 Méthode de contrôle de la compliance.....	105
8.1.6 Modalités de modification du schéma thérapeutique.....	106
8.2 Insuline.....	106
8.3 Traitements autorisés pendant l'essai.....	106
8.4 Traitements non autorisés pendant l'essai.....	106
9. COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES D'ORIGINE HUMAINE	107
10. VIGILANCE DE L'ESSAI	107
10.1 Définition des événements indésirables (dont aspects spécifiques à l'étude).....	107
10.2 Responsabilités de l'investigateur.....	109
10.3 Responsabilités du promoteur :.....	109

10.4 Modalités et délai de déclaration des événements indésirables graves :	109
10.4.1 Modalités de déclaration:.....	110
10.4.2 Suivi des patients en cas de survenue d'un événement indésirable grave.....	110
10.4.3 Délais.....	111
10.4.4 Rapport annuel de sécurité (RAS) :	111
10.5 Autres événements à notifier.....	111
10.5.1 Grossesse L'investigateur en charge du suivi de la patiente doit notifier toute grossesse par fax au :	111
10.6 Événement non graves.....	112
10.7 Faits nouveaux.....	112
10.8 Comité de surveillance de la sécurité de l'étude.....	112
11 RECUEIL ET TRAITEMENT DES DONNEES	113
11.1 Définitions et méthodes de mesure	113
11.1.1 Paramètres cliniques	113
11.1.2 Paramètres para-cliniques	114
11.1.3 Paramètres biologiques	114
11.2 Données cliniques recueillies uniquement dans le cahier d'observation.....	116
11.3 Circuit des données avant la saisie informatique.....	116
11.4 Saisie informatique des données.....	116
11.5 Gestion et conditions d'archivage des documents de l'essai.....	116
11.6 Présentation des autres supports de recueil de données.....	117
12 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	117
12.1 Calcul d'effectif.....	117
12.2 Description du plan d'analyse statistique.....	118
12.3 Résultats attendus.....	122
Résultats.....	123
1ère Partie :	124
Etude de phase 1.....	124
1. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION	125
2. STABILITE	125
3. PARAMETRES DE SURVEILLANCE	128
4. PHARMACOCINETIQUE	128
5. BIODISTRIBUTION.....	129
6. ELIMINATION DU 6-DIG	131
7. DOSIMETRIE.....	131
8. DISCUSSION	132
2ème Partie :	135
Mesure de l'index d'insulinorésistance	135
cardiaque.....	135
1. INTRODUCTION.....	136
2. MATERIEL ET METHODES	136
4. DISCUSSION.....	144
3ème Partie : Optimisation du traitement des données	146
1. INTRODUCTION.....	147
2. MATERIEL ET METHODES	150
2.1. Protocole expérimental	150
2.2. Analyse des images	151
3. RESULTATS.....	159
• Mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque chez les sujets sains en utilisant l'analyse factorielle (évaluation faisabilité et efficacité).....	159
• Mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque chez les sujets diabétiques de type 2 en utilisant en utilisant l'analyse factorielle (évaluation faisabilité et efficacité).....	161
• Etude de la reproductibilité et de la sensibilité de la mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque.....	161
4. DISCUSSION	162
Discussion générale.....	163
Perspectives : protocole de Phase II	169

1. PHASE II	170
2. OBJECTIFS	171
2.1 OBJECTIF PRINCIPAL.....	171
2.2 OBJECTIFS SECONDAIRES.....	171
3. TYPOLOGIE DE L'ESSAI ET PLAN EXPERIMENTAL.....	172
3.1 TYPE D'ESSAI	172
3.2 EXPOSE DU PLAN EXPERIMENTAL	172
3.3 CALENDRIER PREVISIONNEL DE L'ESSAI (FLOW-CHART).....	172
4. Sélection des personnes.....	173
4.1 POPULATIONS ETUDIEES	173
4.2 RECRUTEMENT.....	173
4.2.1 Critères d'inclusion.....	173
4.2.2 Critères de non-inclusion.....	174
4.2.3 Description du mode de recrutement	175
5. Critères d'évaluation	175
5.1 PARAMETRES ETUDIES OU CRITERES D'EFFICACITE.....	175
5.1.1 Définition des paramètres étudiés ou critères d'évaluation (principaux et secondaires) de l'efficacité et technique(s) de mesure	175
5.1.2 Méthodes et calendriers prévus pour mesurer, recueillir, analyser les paramètres étudiés (critères d'efficacité ou autres).....	175
5.1.2.1 Scintigraphie au 6-DIG.....	175
5.1.2.2 - Technique du clamp euglycémique hyperinsulinique.	176
5.1.2.3 - Analyse des anomalies structurelles et fonctionnelles du cœur.	178
5.2 CRITERES DE TOLERANCE.....	178
5.2.1 Définition des critères de tolérance.....	178
5.2.2 Méthodes et calendriers prévus pour mesurer, recueillir, analyser les paramètres d'évaluation de la tolérance.....	179
5.3 CRITERES DE CONTROLE DE LA COMPLIANCE	179
5.3.1 Définition des critères de contrôle de la compliance	179
5.3.2 Méthodes de mesure de la compliance.....	179
6. Réalisation pratique du protocole	179
6.1 PRE-SCREENING.....	179
6.2 VISITE N°1 : INCLUSION (J-7 A J-1).....	179
6.3 VISITE N°2 (J0).....	180
6.4 VISITE N°3 (J-2 A J2)	182
6.5 VISITE N°4	185
6.6 VISITE DE SORTIE D'ETUDE PREMATUREE.....	185
6.7 FIN DE RECHERCHE.....	185
6.7.1 Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire d'une partie ou de la totalité de la recherche	186
6.7.2 Définition de la fin de la recherche sur les personnes	186
7. Recueil et traitement des données	186
9.1 DESCRIPTION DES DONNEES RECUEILLIES.....	186
9.1.1 Paramètres cliniques.....	186
9.1.2 Paramètres para-cliniques.....	186
9.1.3 Paramètres biologiques.....	186
8. Analyse statistique des données.....	187
10.1 RESPONSABLE DE L'ANALYSE STATISTIQUE	187
10.2 CALCUL D'EFFECTIF.....	187
10.3 DESCRIPTION DU PLAN D'ANALYSE STATISTIQUE	188
Seuil statistique et conditions d'applications.....	188
Populations d'analyse.....	188
10.3.1 Analyse des critères principaux.....	188
10.3.2 Analyse des critères secondaires.....	189
Références bibliographiques.....	191

Annexes	211
Abstract et résumé	214

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Modélisation à trois compartiments du transport et du métabolisme du FDG. Cp représente le compartiment plasmatique, Ce' représente le compartiment intracellulaire et Cm' représente la concentration de FDG phosphorylé. Les constantes cinétiques du traceur (K_1' , k_2' et k_3') permettent de quantifier les échanges du traceur entre chaque compartiment (Bertoldo, 2001).

Figure 2. Modélisation à trois compartiments du transport du 3OMG. Cp représente le compartiment plasmatique, Ci représente le compartiment interstitiel et Ce représente le compartiment intracellulaire. Les constantes cinétiques du traceur (k_1 , k_2 , k_3 et k_4) permettent de quantifier les échanges du traceur entre chaque compartiment (Bertoldo, 2005).

Figure 3: Structure chimique 6-[123I]-DIG Poids moléculaire (g/mol): 290,05

Figure 4: solvants résiduels (contrôlés par chromatographie en phase gazeuse Head Space) contrôlés sur les trois lots de validation réalisés pour le DME 1.

Figure 5 : Effets de la concentration de D-glucose sur l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les érythrocytes en suspension à 4°C. Moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$ pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs mesurées en l'absence de D-glucose : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 6 : Cinétiques d'élimination du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les érythrocytes en suspension à 25°C. ■ contrôle, ▨ cytochalasine B (50 μ M). Moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$ pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles mesurées : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 7 : Evolution au cours du temps de l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. ▨ contrôle, ■ insuline (100 UI/l), ▨ cytochalasine B (50 μ M). Moyenne $\pm$ écart-type ($n = 6$ pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles mesurées : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 8 : Effets des concentrations de D-glucose sur l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. Moyenne $\pm$ écart-type ($n = 6$ pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs mesurées en l'absence de D-glucose : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 9: Cinétiques d'élimination du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. ■ contrôle, ▨ cytochalasine B (50 μ M). Moyenne $\pm$ écart-type ($n = 6$ pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 10. Evolution au cours du temps de l'entrée du 6-DIG dans les adipocytes. L'entrée du 6-DIG a été mesurée dans des adipocytes isolés provenant de la graisse épидидymale de rats (A) ou de souris (B) Les adipocytes isolés ont été incubés en l'absence (○) ou en présence de 100nmol/l d'insuline (●) pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4). L'entrée fut initiée par l'addition de 6-DIG (2 μ Ci par essai, concentration finale de 1 mmol/l). Les résultats sont exprimés en pmol/100 μ l de cellules en suspension. Chaque valeur est la moyenne $\pm$ ESM des trois expériences.

Figure 11: Comparaison du transport du 6-DIG (A) et du 3-OMG (B) dans des adipocytes isolés provenant de rats contrôles et de rats STZ. Les adipocytes isolés ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4) en l'absence (barre blanche) et en présence (barre hachurée) de 100nmol/l d'insuline. A la fin de l'incubation, l'entrée a été initiée par l'addition de 6-DIG (0.1mmol/l, 2 μ Ci par essai) ou de 3-OMG (0.1mmol/l, 0.8 μ Ci par essai). Le transport du 6-DIG et du 3-OMG a été stoppé après 30 secondes de condition basale et après 3 ou 20 secondes pour les cellules traitées à l'insuline provenant respectivement des rats contrôles et diabétiques. Les résultats sont exprimés en pmol/min/100 μ l de cellules en suspension. Les valeurs présentées sont les moyennes $\pm$ ESM des trois expériences.

Figure 12 : Comparaison du transport du 6-DIG (A) et du 3-OMG (B) dans des adipocytes isolés provenant de souris contrôles ou rendues obèses par thioglucose d'or. Les adipocytes isolés ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4) en l'absence (barre blanche) et en présence (barre hachurée) de 100nmol/l d'insuline. A la fin de l'incubation, l'entrée a été initiée par l'addition de 6-DIG (0.1mmol/l, 2 μ Ci par essai) ou de 3-OMG (0.1mmol/l, 0.8 μ Ci par essai). Le transport du 6-DIG et du 3-OMG a été stoppé après 30 secondes de condition basale et après 5 ou 20 secondes pour les cellules traitées à l'insuline provenant respectivement des souris minces et obèses. Les résultats sont exprimés en pmol/min/100 μ l de cellules en suspension. Les valeurs présentées sont les moyennes $\pm$ ESM des trois expériences.

Figure 13 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes insulino- sensibles et dans le sang, chez les souris contrôles *db/+*, avec ou sans injection d'insuline. Moyenne $\pm$ écart-type : comparaison à l'état basal versus avec insuline : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 14 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes insulino- sensibles et dans le sang, chez les souris diabétiques *db/db*, avec ou sans injection d'insuline. Moyenne $\pm$ écart-type : comparaison à l'état basal versus avec insuline : NS.

Figure 15: Modèle sélectionné pour l'étude du transport du 6-DIG.

Figure 16 : Protocole expérimental. Les rats ont reçu une première injection de 6- DIG.

Figure 17 : Modèle tri-compartimental proposé pour l'étude du transport du 6-DIG dans le cœur. Le compartiment central représente le sang (q_1), où le traceur était injecté (ex_1) et d'où un transfert irréversible se fait, représentée par le coefficient $k(0,1)$. Ce compartiment a une élimination linéaire et bidirectionnelle, dans deux autres compartiments qui sont représentés par le cœur (q_2) et par le reste du corps (q_3). Ces échanges entre les différents compartiments sont représentés par les coefficients k , $s_1 = q_1/V$, avec V représentant le volume sanguin total et $s_2 = q_2/M$, avec M représentant la masse du cœur.

Figure 18 : Modèle à 3 compartiments.

Figure 19 : Evolution du k_3 chez des rats témoins (noir) et des rats obèses (blanc) entre la condition basale et après le bolus d'insuline. Dans le groupe de rats témoins Wistar, k_3 augmente significativement sous insuline ($p < 0,001$). Par contre, dans le groupe de rats Zucker, insulino-résistants, on n'observe aucune augmentation significative du k_3 sous insuline ($p = 0,131$).

Figure 20 : Cet index d'insulinorésistance musculaire obtenu par méthode graphique permet de séparer significativement les rats Wistar des rats Zucker ($p=0,014$).

Figure 21 : Reproductibilité de la méthode de mesure des index d'IR cardiaque (A) et musculaire (B).

Figure 22 : Sensibilité de la méthode de mesure des index d'IR cardiaque (A) et musculaire (B) (Avant traitement : Jour 0, J0 ; Après traitement : 21 jours, J21).

Figure 23. Stabilité du 6DIG 60 jours après marquage (Colonne : C18 waters spherisorbe 5 μ m ODS2, éluant : H2O pure). Les 2 pics représentés sont caractéristiques du 6-DIG, ils correspondent aux deux formes de la molécule (α et β) qui ne sont pas éluées à la même vitesse.

Figure 24. Etude *in vivo* du métabolisme du 6DIG chez l'homme. Les prélèvements sanguins (A) et urinaires (B) ont été réalisés 45 minutes après l'injection du traceur. Le sérum a été purifié par ultracentrifugation (Etude CLHP colonne C18, phase mobile aqueuse).

Figure 25 : Clairance urinaire cumulée du 6-DIG les 24 premières heures (moyenne $\pm$ SD).
DI : Dose injectée

Figure 26 : Scintigraphie corps entier en vue antérieure après injection du 6-DIG à 1, 2, 4 et 24 heures.

Figure 27 : Protocole scintigraphique pour la mesure de l'insulinorésistance dans le cœur.

Figure 28 : Acquisition d'image du 6-DIG au niveau du cœur

Figure 29 : Modèle mathématique à trois compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le coeur, chez l'homme *in vivo*, par détection externe de la radioactivité.

Figure 30 : Exemple de la distribution aléatoire des résidus.

Figure 31 : Cinétique du 6DIG dans le sang (s1) obtenue après ajustement du modèle aux données.

Figure 32 : Cinétique du 6DIG dans le muscle cardiaque (s2) obtenue après ajustement du modèle aux données.

Figure 33 : Principe de l'analyse factorielle de séquences d'images dynamiques.

Figure 34 : Analyse factorielle de séquences d'images dynamiques en PET cardiaque à l'H2O-15 permettant de déterminer les courbes d'activité des cavités cardiaques droite, gauche et du myocarde.

Figure 35: Suppression de la zone d'injection sur les images d'analyse factorielle.

Figure 36: Résultat de l'analyse factorielle à 5 facteurs permettant d'isoler les compartiments physiologiques représentés par le muscle squelettique (A), les poumons et le ventricule gauche (B), la cavité ventriculaire droite (C), un résidu d'injection (D) et le foie (E).

Figure 37 : Analyse factorielle (décomposition en 5 facteurs) présentation multichrome (A) et courbes d'activité mesurées en fonction du temps selon les compartiments (B).

Figure 38 : Analyse factorielle avec méthode de seuillage pour l'extraction des cavités ventriculaires droite (A) et gauche (B).

Figure 39 : Analyse factorielle à trois facteurs permettant de délimiter manuellement une ROI cœur « total ».

Figure 40 : Détermination de la ROI myocarde en analyse factorielle en retranchant à la ROI du cœur « total » les ROI VD et VG déterminées précédemment par seuillage.

Figure 41 : Modèle mathématique à deux compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le coeur, chez l'homme *in vivo*, par détection externe de la radioactivité.

Figure 42 : Exemple de la distribution aléatoire des résidus pour les deux conditions basale (entre 0 et 15 minutes) et insuline (entre 15 et 30 minutes).

Figure 43 : Cinétique du 6DIG dans le sang (s1).

Figure 44 : Cinétique du 6DIG dans le muscle cardiaque (s2) obtenue après ajustement du modèle aux données.

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution au cours du temps de l'activité du 3-OMG et du 6-DIG dans des cœurs isolés de rats perfusés avec du D-glucose libre.

Tableau 2 : Biodistribution du 3-OMG chez la souris.

Tableau 3 : Biodistribution du 6-DIG chez la souris.

Tableau 4 : Comparaison de la quantité totale de Glut 4 et du taux initial de transport du 6-DIG dans les adipocytes de rats et de souris.

Tableau 5 : Données biologiques chez les contrôles ou rats STZ, traités avec ou sans insuline et examinés 3 ou 10 minutes après l'injection du 6-DIG.

Tableau 6 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes et le sang, chez les souris contrôles *db/+*.

Tableau 7 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes et le sang, chez les souris diabétiques *db/db*.

Tableau 8 : Comparaison des cinétiques du 6-DIG chez des animaux ayant subi un clamp euglycémique hyperinsulinémique *versus* ceux ayant subi un protocole normoglycémique normoinsulinémique, dans les groupes de rats contrôles et de rats rendus insulino-résistants par un régime enrichi en fructose (test ANOVA).

Tableau 9 : coefficients de transfert fractionnel (*k_{ij}*) obtenus à partir du modèle mathématique.

Tableau 10 : Rapports (insuline/basal) des coefficients représentant le transfert du 6-DIG depuis le sang vers le cœur.

Tableau 11 : Biodistribution du 6-DIG chez la souris

Tableau 12 : Biodistribution du 6DIG durant les 24 premières heures après l'injection du traceur. Les résultats sont exprimés en % de la dose injectée $\pm$ SD

Tableau 13 : Dosimétrie

LISTES DES ABREVIATIONS FREQUEMMENT UTILISEES

3-OMG : 3-O-Méthyl-Glucose

6-DIG ou 6DIG : 6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

EMA : European Medicines Agency

FDG: 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose

HDL: High Density Lipoprotein

HOMA : Homeostasis Model Assessment

ICH: International Conference on Harmonisation

IV : Intraveineuse

IR : Insulinorésistance

MBq : MégaBecquerel

mCi : MilliCurie

mSv : MilliSievert

MINIMOD : minimal model software program

NaCl : Chlorure de sodium

NaI : Iodure de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

STZ: Streptozotocine

TEP: Tomographie par Emission de Positrons

Vd : Volume de distribution

ZDF : Zucker Diabetic Fatty rats

Introduction générale

L'insulinorésistance, caractérisée par une diminution de la sensibilité à l'insuline dans les organes insulinosensibles, est l'un des éléments clefs du syndrome métabolique ([Reaven, 1988](#)). Ce syndrome est caractérisé par une obésité centrale, une hypertension artérielle, une anomalie de la régulation du glucose et une dyslipidémie avec triglycérides élevés et faibles taux de HDL.

Quels que soient les critères de définition de ce syndrome (OMS, National Cholesterol Education Programm), sa prévalence atteint 15 % en Europe et près d'un sujet sur 4 aux Etats-Unis. Chez les personnes non diabétiques, ce syndrome est responsable d'une augmentation de la mortalité, toutes causes confondues, l'une des causes majeures étant les maladies cardiovasculaires. Chez les patients diabétiques de type 2, la présence d'un syndrome métabolique entraîne une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires. La prévalence du syndrome métabolique est amenée à augmenter dans un futur proche, conséquence de l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité ([Zimmet, 2001](#)).

S'il existe actuellement des discussions sur les critères à prendre en compte pour chaque composant du syndrome métabolique ou sur les valeurs seuils de ces critères, la communauté scientifique est unanime sur le fait qu'il n'existe pas de méthode simple, utilisable en clinique pour mesurer l'insulinorésistance, élément clef du syndrome métabolique. La seule méthode reconnue est le clamp euglycémique hyperinsulinémique, qui reste la technique de référence mais nécessite des protocoles complexes et contraignants pour le patient, et ne peut être envisagé en routine clinique.

De nombreuses méthodes alternatives ont été proposées pour mesurer la sensibilité à l'insuline chez l'homme ([Radziuk, 2000](#)). Les plus simples, mais aussi les moins informatives, se font à l'état basal et utilisent les mesures plasmatiques de la glycémie et de l'insulinémie (HOMA, MINIMOD). Des techniques *in vivo* plus complexes permettant chez l'homme l'étude du métabolisme et du transport du glucose dans un organe donné ont été

proposées : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire avec le [13C]-glucose, TEP au [18F]-2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (18-FDG), ou encore techniques de dilution de traceurs utilisant le [14C]-3-O-Méthyl-Glucose (3-OMG), traceur de référence du transport du glucose. Cependant, aucune de ces méthodes n'a trouvé d'application clinique quotidienne du fait de la difficulté de mise en œuvre de ces techniques.

Notre projet porte sur le transfert à l'homme d'une technique simple de mesure de l'insulinorésistance, parfaitement validée chez l'animal, et reposant sur l'utilisation en médecine nucléaire d'un traceur du transport cellulaire du glucose marqué à l'iode 123. En effet, un analogue iodé du glucose, le 6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose (6-DIG), a été développé et validé au sein de l'Unité Mixte de Recherche INSERM U-1039 comme traceur pur du transport du glucose. Il est proposé pour l'appréciation *in vivo* de l'insulinorésistance (Henry, 1997 - Henry, 1997). En effet celui-ci comme le 3-OMG est un traceur pur du transport du glucose, à la différence du [18F]-2- fluoro-2-déoxy-D-glucose ou FDG qui lui est métabolisé après son entrée dans les cellules et ne reflète donc pas uniquement le transport du glucose.

Des études *in vivo* de biodistribution du 6-DIG ont été réalisées en présence ou en l'absence d'insuline chez des souris génétiquement diabétiques (*db/db*), présentant donc une insulinorésistance sévère, et chez des rats rendus insulinorésistants par un régime enrichi en fructose, au stade pré-diabétique. Il a été montré que le 6-DIG permet de mettre en évidence, *in vivo*, des variations fines du transport du glucose dans les organes insulinosensibles (Perret, 2003 - Slimani, 2002 - Perret, 2007). Un protocole d'imagerie, simple et rapide (45 minutes), a ensuite été développé à l'aide d'une γ -caméra dédiée au petit animal : il permet d'obtenir un index chiffré d'insulinorésistance par organe et qui peut être directement transférable à l'homme. Les dernières études réalisées sur le cœur et sur le muscle squelettique avec ce protocole ont permis de montrer la reproductibilité et la sensibilité de la technique (Briat, 2007). C'est la première fois qu'il est possible en imagerie avec le 6-DIG d'évaluer différents degrés de résistance à l'insuline chez le rat. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation

du 6-DIG chez l'homme dans les services de Médecine Nucléaire, comme nouvel outil diagnostique pour le dépistage de la résistance à l'insuline et c'est l'objet de ce projet. Les performances de cet outil diagnostique chez l'homme, en SPECT, restent à démontrer. La molécule de 6-DIG et l'originalité de son utilisation pour la mesure de l'insulinorésistance ont fait l'objet de deux dépôts de brevet : l'un avec la Société ERAS labo (Bignan, 1995) et le second avec comme déposants l'université Joseph Fourier et l'INSERM (Fagret, 2008). La commercialisation du 6-DIG par l'un des industriels du radiopharmaceutique sera envisageable si l'on parvient à démontrer chez l'homme la pertinence diagnostique de la technique.

Il est difficile d'apprécier l'impact de ce nouveau test diagnostique en termes médical et médico-économique. L'insulinorésistance est au cœur du syndrome métabolique, présente dans la phase silencieuse de l'évolution du diabète de type 2, et est considérée comme un facteur de risque à part entière des maladies cardiovasculaires. On est donc en droit de penser que son dépistage précoce permettra, avec l'avancée des connaissances biologiques sur la physiopathologie de ces maladies et les nouveaux traitements, une prise en charge des patients à risque plus précoce et entraînera un gain pronostique et possiblement un coût moindre pour la société. La technique proposée présentera par ailleurs l'avantage de permettre un diagnostic précis, rapide et sans contrainte pour le patient.

Mon travail, qui s'inscrit dans la continuité des études menées par l'UMR_S U 1039, a été subdivisé en 3 parties dans une démarche de recherche translationnelle.

L'objectif principal était d'évaluer la tolérance de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez les volontaires sains et les diabétiques.

La seconde partie a porté sur l'évaluation de la faisabilité de la technique chez les volontaires sains et les diabétiques.

Enfin, une troisième partie a été consacrée à l'optimisation du traitement des données

obtenues avec le 6-DIG.

Notre objectif final est de déterminer avec le 6-DIG un index d'insulinorésistance nous permettant de discriminer une population résistante d'une population sensible à l'insuline, et dévaluer son intérêt dans la prédiction d'apparition d'un diabète avéré et dans la détermination du risque cardiovasculaire par imagerie.

**Pourquoi développer
une nouvelle méthode
de mesure de
l'insulinorésistance ?**

1. L'insulinorésistance :

L'insulino-résistance (IR) se caractérise par une réponse inadaptée des cellules cibles de l'insuline à des concentrations physiologiques en insuline, compensée par une hypersécrétion d'insuline et se traduisant par une hyperinsulinémie. Cette hyperinsulinémie compensatrice permet le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique (Wang, 2004). L'insulino-résistance est associée à de nombreuses pathologies. Elle est fortement liée à l'obésité, puisque la majorité des individus insulinorésistants sont en surpoids ou obèses (Mokdad, 2000) et est un élément prépondérant dans le syndrome métabolique (Reaven, 1988). Reaven qui a décrit le premier ce syndrome définit l'IR comme l'élément physiopathologique principal de ce syndrome et en constitue un facteur de risque cardiovasculaire à part entière (Reaven, 1995). Elle est en outre un élément central de la physiopathologie du diabète de type 2, qui associe au défaut de sensibilité à l'insuline à un défaut de sécrétion d'insuline. Plus important encore, l'IR peut précéder l'apparition du diabète de 5 et 7 ans (Reaven, 2005 ; Lebovitz, 1999 ; Sattar, 2008).

L'insulino-résistance se manifeste principalement par un défaut d'action de l'insuline sur les tissus cibles qui sont les organes insulinosensibles parmi lesquels on trouve le muscle cardiaque, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie. Elle se traduit par un défaut de transport du glucose. L'IR résulte d'une diminution de la translocation membranaire des GLUT-4 (transporteurs du glucose), dont le mécanisme moléculaire reste encore mal défini (Garvey, 1998). En effet l'étiologie de l'IR est encore mal connue, elle inclut des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux : alimentation, activité physique, âge, tabac, médication (Zhu, 2004). Le facteur le plus important est l'obésité qui combine à la fois les facteurs environnementaux et génétiques (Cummings, 2003). Chez certains sujets obèses, le tissu adipeux n'est plus sensible aux effets anti-lipolytiques de l'insuline, et libère de grandes

quantités d'acides gras libres qui participent au développement de l'IR, on parle de "lipotoxicité" et plus récemment a été proposé le terme d'adiposopathie (Bays, 2011). Un excès de graisse peri-viscérale avec une dysrégulation du tissu adipeux et de sa fonction endocrine pourrait être au centre du problème, entraînant un état inflammatoire de "bas grade", impliqué dans la diminution de la sensibilité à l'insuline (Curat, 2004 ; Houstis, 2006). Philip Randle et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer à partir d'expériences réalisées ex vivo sur le modèle de coeur de rat isolé et perfusé, l'existence d'un cycle "glucose-acides gras" (Randle, 1963). Une augmentation de la concentration des AGL dans le milieu de perfusion conduisait à une réduction de la captation et de l'utilisation du glucose par le myocarde. Il avait ensuite généralisé ces observations au muscle squelettique. Quelques années plus tard, il a été démontré que les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires étaient aussi importants pour le cycle "glucose-acides gras" que les acides gras provenant de la circulation sanguine (Zierler, 1976). G. Shulman étudie le transport du glucose en Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (SRMN) chez des sujets sains perfusés avec des acides gras pendant 5 heures, lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Il observe bien une diminution de 50% de la captation de glucose, mais aussi une diminution du glucose intracellulaire (Shulman, 2004), ce qui indiquerait que le défaut de transport du glucose est la première étape affectée par l'excès d'acides gras (Shulman, 2004). D'autres études par SRMN montrent une corrélation entre les concentrations de triglycérides dans le muscle squelettique et l'IR chez l'homme (Perseghin, 1999).

2. Insulinorésistance et complications cardiovasculaires

L'IR apparaît comme un possible facteur de risques cardiovasculaire (Bays, 2011 ; Sjostrom, 2012). En effet, les patients présentant une IR présentent un risque cardiovasculaire supérieur à celui des personnes saines (Gami, 2007). Le risque de maladies coronaires est 3 à 4 fois plus élevé ainsi que le risque de décès cardiovasculaire (Lakka, 2002 ; Malik, 2004). D'autre part,

les patients porteurs d'une IR progressent souvent vers l'apparition d'un diabète de type 2, pour lequel les risques cardiovasculaires sont multipliés par trois par rapport à un individu sain (Almgren 2007). Parmi les complications macro-vasculaires, une majorité d'événements seront coronaires avec un risque coronarien multiplié par 2 (Booth, 2006). Enfin il faut noter qu'un diabétique de type 2 sans antécédent de complications cardiovasculaires présente le même risque coronarien qu'un patient non diabétique ayant présenté un infarctus (Schramm, 2008). Par ailleurs la glucotoxicité liée à l'hyperglycémie chronique est responsable de nombreuses complications microcirculatoires, dont la néphropathie, qui pourront à leur tour augmenter le risque cardiovasculaire (UKPDS 74, 2006).

Les mécanismes impliquant l'insulinorésistance dans le risque cardiovasculaire sont multiples. A titre d'exemple, l'hyperinsulinémie a un rôle activateur des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'action vasoconstrictrice (Potenza, 2005) et entraîne une dysfonction endothéliale (Montagnani, 2002). Il a été montré que des concentrations élevées d'acides gras libres (AGL) entraînent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Inoguchi, 2000) et inhibent la NO synthase endothéliale (Wang, 2006). Cette forte concentration en AGL augmente aussi l'activité du système sympathique, les concentrations plasmatiques en catécholamines (Paolisso, 2000) et l'activité du système rénine-angiotensine (Watanabe, 2005). On peut enfin parler de véritable dysfonction d'organe pour la graisse péri-viscérale chez les patients avec une IR. Sa fonction endocrine perturbée induit la sécrétion de nombreuses molécules inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et les ROS (Shoelson, 2006 ; Houstis, 2006) néfastes sur le plan cardiovasculaire (Bays, 2011).

Plusieurs données scientifiques montrent aussi une forte corrélation entre l'insuffisance cardiaque et l'insulino-résistance, et placent même cette dernière comme facteur étiologique primaire dans le développement d'une cardiomyopathie dilatée non ischémique (Witteles, 2008). En effet, c'est dans les années 70 que le concept de cardiopathie diabétique a émergé (Rubler, 1972 ; Hamby 1974), mais c'est en 1888 que Mayer avait, le premier, évoqué le lien

entre les anomalies métaboliques et l'insuffisance cardiaque ([Mayer, 1888](#)). Depuis, plusieurs études sont venues confirmer ce lien. Tout d'abord, une augmentation dramatique de la prévalence des cardiopathies dilatées chez les diabétiques a été montrée par les études observationnelles et épidémiologiques ([Coughlin, 1994](#) ; [Ingelsson, 2005](#)). Ainsi une augmentation de l'HbA1C de 1% entraîne une augmentation de 8% du risque de développer une insuffisance cardiaque et cela après ajustement des autres facteurs de risque, et surtout en présence d'une cardiopathie ischémique ([Iribarren, 2001](#)).

Alors que les anomalies de structure et de fonction myocardique dans la cardiopathie diabétique sont bien connues et décrites, associant principalement hypertrophie et trouble diastolique au début de la maladie ([Boudina, 2007](#)), celles-ci sont aussi corrélées à l'insulinorésistance sans que les patients ne présentent un véritable diabète ([Verdecchia, 1999](#)). Les données épidémiologiques suggèrent aussi que l'insulino-résistance précède l'apparition de l'insuffisance cardiaque de plusieurs années ([Arnlov, 2001](#)). Plusieurs éléments soulèvent aussi le rôle pronostique de l'insulino-résistance dans l'évolution de l'insuffisance cardiaque. Ainsi celle-ci impacte-t-elle négativement le pic de VO₂ max ([Suskin, 2000](#)) et la fraction d'éjection ([Paolisso, 1999](#)). Enfin, une réponse moins importante au traitement standard, notamment des bêta-bloquants, a été décrite chez les patients présentant une insulino-résistance ([Hasegawa, 2004](#)).

Les mécanismes de l'insulino-résistance cardiaque comme de l'insulinorésistance systémique restent complexes et incomplètement connus. Il est certain que plusieurs mécanismes participent, au développement d'une cardiopathie diabétique ou non, autres que les anomalies du métabolisme cardiaque. On peut citer par exemple la dysfonction endothéliale, l'atteinte de la microcirculation, le développement d'une hypertrophie ventriculaire par modification de la matrice extracellulaire avec apparition de fibrose, ou encore les anomalies d'utilisation du calcium intracellulaire ([An, 2006](#)). Cependant la régulation du métabolisme cardiaque joue un rôle central dans l'adaptation de celui-ci à différentes situations. Pour résumer, un myocarde

qui présentera une insulino-résistance, en réponse à une agression ou un stress, sera incapable de modifier son métabolisme et d'augmenter la production énergétique. Le glucose est en effet le substrat préférentiel en condition d'hypoxie comme lors de l'ischémie ou lors d'une charge de travail accrue. En outre, l'oxydation du glucose dans des conditions aérobies présente un rendement énergétique plus important que l'oxydation des acides gras. La résistance à l'insuline empêcherait cette réponse adaptative et entraînerait des dégâts encore plus importants en contribuant à la lipotoxicité, l'augmentation de la stimulation sympathique, l'inflammation, le stress oxydatif, et la fibrose (Witteles, 2008). Les multiples contre-régulations hormonales comme l'augmentation des catécholamines circulantes vont à leur tour altérer le métabolisme du glucose, entraînant une insulino-résistance et la mise en place d'un véritable cercle vicieux une fois l'insuffisance cardiaque installée (Nikolaidis, 2004).

De manière intéressante, il existe un bon nombre d'élégantes études fondamentales mettant en évidence le rôle du métabolisme énergétique et de l'insulino-résistance dans l'insuffisance cardiaque. Par exemple un modèle murin sur-exprimant les GLUT-1 et 4 va présenter une résistance aux dégâts engendrés par l'ischémie. C'est à dire qu'une adaptation métabolique « optimale » conférerait au myocarde des propriétés cardioprotectrices (Tian, 2001).

De plus la correction des anomalies métaboliques inverse le développement des cardiopathies dans certaines études fondamentales (Belke, 2000).

Ces liens importants existant entre l'insuffisance cardiaque et l'insulino-résistance font penser que de nouvelles voies thérapeutiques pourraient voir le jour. Si les traitements classiques de l'insuffisance cardiaque comme l'amélioration de l'hygiène de vie, l'activité physique (Tuomilehto, 2001), les IEC (Yusuf, 2000) et les statines (Freeman, 2001) diminuent l'insulino-résistance, les bêtabloquants quant à eux ont un effet délétère voire neutre pour le carvedilol (Bakris, 2004). Cependant, d'autres voies thérapeutiques sont possibles. Elles sont principalement au nombre de deux avec les modulateurs métaboliques d'une part et les molécules antidiabétiques d'autre part.

Les modulateurs métaboliques sont des molécules qui augmentent le métabolisme du glucose et baissent celui des acides gras libres. Ces molécules ont été principalement développées comme anti-angineux, mais des études intéressantes montrent leurs effets dans l'insuffisance cardiaque ([Fragasso, 2006](#) ; [Lee, 2005](#)). Cependant les effectifs de ces études restent faibles et les résultats à plus grande échelle ne sont pas confirmés.

Théoriquement, les médicaments ayant une action connue sur l'insulinorésistance comme la metformine et les glitazones pourraient avoir un effet bénéfique dans l'insuffisance cardiaque. Cependant l'utilisation de la metformine expose dans ce contexte au risque d'acidose lactique et les preuves de l'amélioration du métabolisme cardiaque restent négative ([Hallsten, 2004](#)).

Cependant Eurich et coll. ont réalisé une méta-analyse de tous les résultats des études évaluant les antidiabétiques chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque et de diabète. Ils ont conclu que "la metformine est le seul antidiabétique n'étant pas associé à un effet néfaste" et est même associé à une réduction de la mortalité ([Eurich, 2007](#)). Le rôle de la metformine dans cette indication est donc à préciser.

Pour les glitazones, leur contre-indication dans l'insuffisance cardiaque et la controverse existant sur une possible augmentation du taux d'infarctus du myocarde avec ces médicaments ([Nissen, 2007](#)) rendent peu probable le développement de cette voie thérapeutique.

L'espoir pourrait venir des nouvelles classes thérapeutiques comme les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-IV dont l'évaluation dans le cadre de l'insuffisance cardiaque reste encore limitée. Une équipe montre que l'administration de GLP-1 en post infarctus entraîne une amélioration de la fraction d'éjection en comparaison avec un groupe contrôle ([Nikolaidis, 2004](#)). D'autres auteurs montrent une amélioration des seuils ischémiques en échographie dobutamine chez les patients avec une maladie coronaire avérée et sous inhibiteurs de la DPP-IV ([Read, 2010](#)). Toutes ces pistes doivent être confirmées par des études randomisées de grande envergure.

Il est probable qu'une mesure de l'insulino-résistance cardiaque rapide et reproductible par le 6-DIG permettrait le développement et l'évaluation de ces nouvelles thérapeutiques en s'inscrivant comme test intermédiaire.

3. Obésité, syndrome métabolique, diabète de type 2 et insuffisance cardiaque : problèmes de santé publique.

La prévalence de l'obésité a quasiment doublé en près de trente ans dans le monde et touche cinq cents millions d'adultes, et davantage les femmes que les hommes ([Finucane, 2011](#)). Quant à l'obésité infantile, elle a plus que doublé et a même triplé chez les adolescents au cours des 30 dernières années ([Ogden, 2012](#)). On peut même parler d'épidémie mondiale. Quelle que soit la définition considérée, la prévalence du syndrome métabolique est aussi en augmentation constante dans le monde ([Grundy, 2008](#)). En France, elle est de 21% pour l'homme et 17% pour la femme ([Balkau, 2007](#)). Celle du diabète de type 2 a triplé au cours des trente dernières années. Actuellement, le diabète de type 2 touche environ 20 millions de personnes aux Etats-Unis, 171 millions de personnes dans le monde et ce chiffre devrait atteindre 366 millions en 2030 ([Wild, 2004](#)). Si l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique apparaissent comme des problèmes de santé publique, il en est aussi de même pour l'insuffisance cardiaque avec une augmentation de sa prévalence dans le monde. Celle-ci touche 2 à 3 % de la population ([Dickstein, 2008](#)), reste très handicapante, avec un pronostic sévère, et engendre d'énormes dépenses de santé ([Jhund, 2009](#) ; [Shafazand 2009](#)).

4. Méthodes d'évaluation de l'insulino-résistance in Vivo :

Malgré le rôle central de l'IR dans la physiopathologie de ces maladies préoccupantes en termes de santé publique, il n'existe pas de méthode satisfaisante de sa mesure pour la recherche clinique. La technique de référence reste le clamp euglycémique

hyperinsulinémique. Cependant, la complexité et la longueur de cette technique la rendent impropre à l'utilisation clinique de routine. De nombreuses méthodes ou d'index ont été proposés pour évaluer la résistance à l'insuline chez l'homme, mais aucune n'a montré suffisamment de pertinence pour être utilisée dans un usage clinique. On peut les classer en 3 catégories ([Muniyappa, 2008](#)) : les méthodes directes, indirectes et dites simples. Toutes proposent une évaluation de l'insulinorésistance systémique mais ne permettent pas la mesure de la résistance à l'insuline par organe. Bien que chez de nombreux patients l'IR soit développée simultanément dans plusieurs organes, la sévérité de la résistance à l'insuline peut varier entre les différents tissus ([Abdul-Ghani, 2007](#)) ceci est donc important à évaluer. Comme nous l'avons vu, il y a de plus en plus de preuves en faveur de la résistance à l'insuline comme facteur étiologique primaire dans le développement de l'insuffisance cardiaque non ischémique. L'évaluation de l'IR de cet organe paraît donc intéressante. Certaines techniques de médecine nucléaire et de résonnance magnétique permettent de mesurer le métabolisme du glucose et/ou son transport dans différents organes, cependant elles doivent être associées à un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Le chapitre suivant résume les méthodes de l'ensemble des techniques actuellement disponibles.

3.1. Les méthodes directes de mesure

3.1.1 Le clamp euglycémique hyperinsulinémique

Cette technique de mesure, développée par Ralph DeFronzo et collaborateurs ([DeFronzo, 1979](#)), est considérée comme la technique de référence pour la mesure de la sensibilité à l'insuline. Elle consiste à perfuser au sujet de l'insuline exogène à débit constant. Cette perfusion a pour but de placer le sujet en hyperinsulinémie et par conséquent d'augmenter le transport du glucose dans les tissus sensibles à l'insuline, et également d'inhiber la production hépatique de glucose. La glycémie du sujet est suivie tout au long du protocole, elle est dite

"clampée" à sa valeur mesurée à jeun, c'est-à-dire qu'elle est maintenue constante grâce à une perfusion variable de glucose exogène. Après 2 à 3 heures de perfusion, un état d'équilibre est atteint pour lequel la production endogène de glucose est inhibée, ce qui signifie que l'intégralité du glucose perfusé est assimilé par les tissus insulinosensibles. Le "Glucose Infusion Rate" (GIR) est alors calculé, il correspond à la quantité de glucose perfusée pour maintenir la glycémie constante, à l'état d'équilibre. Il reflète le taux d'élimination du glucose sous insuline (M). La valeur M est normalisée au poids de l'individu afin de s'affranchir de la sous-estimation de la consommation du glucose chez l'obèse, expliquée par un volume de distribution plus important. Elle permet aussi de calculer un index de sensibilité qui est défini par $SI_{Clamp} = M / (G \times \Delta I)$, où G est la concentration de glucose à l'équilibre et ΔI la différence entre les concentrations plasmatiques d'insuline à jeun et à l'état d'équilibre. La technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique est simple à interpréter : plus la quantité de glucose à perfuser pour maintenir l'euglycémie est faible, moins les muscles consomment du glucose et plus le sujet est considéré comme insulino-résistant.

Limites : Cette méthode est longue et demande des équipes expérimentées afin d'être fiable ([Pacini, 2003](#)). Elle nécessite pour être correcte dans l'interprétation de ses résultats une obtention de l'état d'équilibre qui répond à une définition précise. Il faut aussi s'assurer de la suppression de la synthèse de glucose par le foie. Cependant il peut y avoir une suppression incomplète dans les populations insulino-résistantes. Pour résoudre ce problème, il est possible d'utiliser des traceurs de glucose radiomarqués permettant d'estimer la production hépatique et de faire les corrections appropriées ([Radziuk, 2002](#)). Une autre approche consiste à choisir un débit de perfusion d'insuline qui soit suffisamment élevé pour supprimer complètement la production hépatique en fonction de la résistance de la population à étudier. Il existe aussi une différence plus importante de la glycémie en artériel et en veineux en proportion de la sensibilité à l'insuline. Par conséquent, l'ajustement des taux de perfusion de glucose sur la base d'un prélèvement veineux de glucose peut conduire à une surestimation de la sensibilité à

l'insuline. Pour minimiser ce problème, la main utilisée pour le prélèvement sanguin veineux est réchauffée avec un coussin chauffant pour "Artérialiser" le sang veineux. Elle ne peut donc pas s'inscrire dans le cadre d'études épidémiologiques visant à mesurer la sensibilité à l'insuline sur des grandes cohortes de patients.

3.1.2. Le test de suppression insulinique

La somatostatine est perfusée par voie intraveineuse pour supprimer la sécrétion endogène d'insuline et de glucagon. Simultanément, insuline et glucose sont infusés dans la même veine du pli du coude pendant 3 h. Des échantillons de sang pour la mesure de la glycémie et de l'insulinémie sont réalisés toutes les 30 minutes pendant 2,5 h, puis à 10 min pour les dernières minutes de l'examen. L'état d'équilibre est supposé être de 150 à 180 min après initiation du test. Les concentrations plasmatiques en insuline sont généralement similaires chez les sujets. Par conséquent, la concentration plasmatique en glucose sera élevée chez le sujet insulino-résistant et plus faible chez le sujet insulinosensible. Cette technique corrèle bien au clamp ($r=0,93$) ([Greenfield, 1981](#)).

Limites : Elle reste comme le clamp euglycémique hyperinsulinémique une technique lourde et longue peu applicable à des études avec de grandes cohortes.

3.2. Les méthodes indirectes de mesure

3.2.1. Analyse par "Minimal Model" (MINMOD)

Le "minimal model" de Bergman repose sur une hyperglycémie provoquée par voie veineuse, associée à une modélisation mathématique des cinétiques de la glycémie et de l'insulinémie suivies par 28 prélèvements sanguins sur 180 minutes ([Bergman, 1979](#)). Après un jeûne de la nuit, un bolus intraveineux de glucose est perfusé pendant 2 min, l'insuline est également

infusée pendant 5 min à partir du 20 min après le bolus de glucose par voie intraveineuse. Ce modèle fournit deux indices de sensibilité à l'insuline. Il présente l'avantage de fournir des données dynamiques permettant de mesurer d'autres paramètres comme l'indice d'efficacité de glucose qui est défini comme la capacité du glucose à promouvoir sa propre élimination et inhiber la production hépatique du glucose en l'absence d'effet de l'insuline.

Limites : La technique reste encore lourde avec de nombreux prélèvements et une durée de 3 heures. De plus la modélisation utilise une simplification de l'homéostasie du glucose qui explique que le minimal model corrèle peu avec les données du clamp ($r=0,55$) ([Saad, 1994](#)).

3.2.2. Test de tolérance au glucose par voie orale ("Oral Glucose Tolerance Test", OGTT) et index dérivés

L'OGTT (ou Hyper Glycémie Provoquée par voie Orale, HGPO) est un test simple, utilisé en routine clinique. Après une nuit de jeûne, des échantillons de sang, pour détermination des concentrations de glucose et de l'insuline, sont prélevés à 0, 30, 60 et 120 minutes après une charge orale de glucose (75 g). La tolérance au glucose est reflétée par l'efficacité de l'organisme à faire diminuer la glycémie après une charge en glucose. Toutefois, l'OGTT fournit des informations sur la tolérance au glucose, mais pas sur la sensibilité à l'insuline, qui demeurent deux concepts distincts. Par contre, de nombreux index, basés sur la méthode de l'OGTT ont été proposés. Deux sont fréquemment utilisés et assez bien corrélés avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique. La formule proposée par M. Mastuda et R. DeFronzo repose sur les valeurs moyennes de glycémie et d'insulinémie à jeun et au cours du test ([Matsuda, 1999](#)) ; la formule proposée par M. Stumvoll utilise moins de valeurs de glycémie et d'insulinémie mais incorpore l'index de masse corporelle ([Stumvoll, 2000](#)). D'autres formules ont été proposées : 1) l'index ISI_{0,120}, proposé par M. Gutt, repose sur le poids, les valeurs d'insuline et de glycémie à jeun et après 2 heures d'OGTT. Il est corrélé avec le

clamp euglycémique hyperinsulinémique ($r=0,63$) (Gutt, 2000) et présente une bonne valeur prédictive pour la survenue du diabète de type 2 ; une bonne corrélation avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique est obtenue en tenant compte de l'excrétion urinaire du glucose au cours de l'OGTT (coefficient de corrélation de Pearson à 0,869) (Soonthornpun, 2003). 2) A. Mari a proposé des méthodes de modélisation permettant d'évaluer la sensibilité et la sécrétion d'insuline à partir d'OGTT réalisés sur 2 ou 3 heures (corrélation avec le clamp : $r=0,77$) (Mari, 2001).

Limites : Elle nécessite de réaliser le test sur 2 à 3 heures. Ces méthodes sont souvent mises en défaut chez les sujets diabétiques, car une sécrétion d'insuline insuffisante ne permet pas d'évaluer son action sur la capacité de captation du glucose (Pacini, 2003). Bien qu'il existe des modélisations pour l'étude de la sensibilité musculaire et hépatique (Abdul-Ghani) il n'en existe pas pour la mesure de l'insulinorésistance cardiaque.

3.3. Méthodes simples : Index basés sur les concentrations à jeun d'insuline et de glucose

3.3.1. "HOMeostasis Model Assessment" (HOMA)

Parmi les index basés sur les concentrations à jeun d'insuline et de glucose, le plus utilisé et le mieux validé est celui obtenu par le modèle HOMA. Il s'agit d'un modèle mathématique basé sur les réponses quantitatives des principaux organes impliqués dans l'homéostasie du glucose. Cette méthode permet de caractériser les anomalies de la sensibilité et de la sécrétion insulinaire à partir des concentrations plasmatiques à jeun de glucose (G_0) et d'insuline (I_0). L'index HOMA est donné par la formule : $IR-HOMA = (I_0 \times G_0)/22,5$.

Limites : La corrélation entre les valeurs du IR-HOMA et celles du clamp euglycémique hyperinsulinémique est très variable d'une étude à l'autre, et reste modeste ($r= 0,34$ à $0,40$) (Muniyappa, 2009). Cependant, l'index HOMA et le clamp euglycémique n'explorent pas les mêmes domaines de la sensibilité à l'insuline. À jeun, l'insuline plasmatique a une action beaucoup plus importante sur l'inhibition de la production hépatique de glucose que sur

l'utilisation périphérique du glucose, aussi l'index HOMA est avant tout un reflet de l'IR hépatique (Tripathy, 2004). A l'opposé, le GIR obtenu lors d'un clamp euglycémique reflète l'effet périphérique, principalement musculaire de l'insuline sur la captation de glucose. De plus, il n'existe pas de standardisation du dosage de l'insuline, les comparaisons entre les différentes études ayant utilisé l'index HOMA sont hasardeuses et la définition d'un seuil à partir duquel on peut parler d'IR est difficile à déterminer.

3.3.2. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index" (QUICKI)

Le QUICKI est obtenu de façon empirique à partir des concentrations plasmatiques à jeun de glucose (G0) et d'insuline (I0). L'index QUICKI est donné par la formule : $IR-QUICKI = 1 / (\text{Log } I0 + \text{Log } G0)$.

Limites : Comme le HOMA, les corrélations de l'index QUICKI avec le clamp euglycémique sont modestes ($R = 0,57$) (Katz, 2000) et il ne dispose pas de standardisation dans sa mesure.

3.4. Méthodes de mesure de l'insulinorésistance par organe in vivo

3.4.1. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (SRMN)

La SRMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Il est possible de mesurer la concentration et la vitesse de synthèse du glycogène, en observant le signal émis par le carbone 13 placé dans un haut champ magnétique. En perfusant au sujet du glucose marqué au ^{13}C en position 1, il est possible de suivre la synthèse de glycogène au cours d'une épreuve de clamp euglycémique hyperinsulinémique. La SRMN a été largement utilisée pour l'étude du métabolisme du glycogène dans le muscle squelettique avec une validation face à la biopsie musculaire (Roden, 1999) et permet de mettre en évidence un défaut de synthèse de glycogène chez les sujets diabétiques (Rothman, 1991).

Limites : Outre un appareillage non disponible de manière courante, les données nécessitent un traitement comprenant des corrections complexes demandant une expertise peu répandue. Enfin elle nécessite encore un clamp.

3.4.2. La technique de dilution des multiples traceurs

Cette technique est basée sur l'injection simultanée de plusieurs traceurs à l'entrée de l'organe d'intérêt et sur l'étude de leurs courbes de ressortie. Suivant les traceurs utilisés, cette technique permet d'explorer la sensibilité à l'insuline, à travers le métabolisme glucidique ou le métabolisme des acides gras. Pour le métabolisme du glucose, un ou plusieurs traceurs sont perfusés seuls ou simultanément avec de l'insuline. Une étude complète nécessite la coinjection d'un marqueur vasculaire (qui ne traverse pas l'endothélium des capillaires), d'un marqueur extracellulaire (qui ne pénètre pas dans la cellule une fois parvenu dans le milieu interstitiel), d'un marqueur du transport du glucose (qui entre dans les cellules de l'organe par les GLUTs et qui en ressort sans être modifié), et enfin de glucose. Pour l'étude de l'étape de transport du glucose, la combinaison la plus retenue est la co-injection d'un marqueur extracellulaire et d'un marqueur de transport. Les deux traceurs extracellulaires les plus utilisés sont le [3H]-L-glucose et le [3H]-D-mannitol. Concernant le transport du glucose, le traceur de référence est le [14C]-3-O-méthyl-D-glucose (3-OMG). Le 3-OMG a un comportement similaire à celui du glucose *in vitro* et *in vivo* ([Carruthers, 1990](#)). Il entre dans la cellule par les mêmes transporteurs que le glucose et n'étant pas phosphorylé, il ressort librement, traçant ainsi uniquement l'étape de transport. Le modèle mathématique développé pour analyser les cinétiques du 3-OMG dans le muscle squelettique est un modèle multicompartimental à 15 compartiments. Cette complexité vient du fait que le carbone 14 n'est pas détectable par voie externe, donc les mesures ne sont réalisées qu'au niveau sanguin. De plus, ce modèle prend en compte les échanges du traceur avec les globules rouges,

l'hétérogénéité du débit sanguin au sein du muscle squelettique et les échanges du traceur entre le milieu interstitiel et le milieu intracellulaire. Cette technique ne requiert aucune technologie sophistiquée, elle permet de décrire le tissu de façon plausible car la modélisation permet de prendre en compte tous les échanges compartimentaux, et permet d'obtenir des paramètres cinétiques de transport du glucose in vivo.

Limites : L'analyse des résultats de cette technique est relativement complexe. De plus, elle ne permet pas l'acquisition d'images, nécessite plusieurs prélèvements sanguins et ne permet donc pas de localiser les phénomènes métaboliques au sein d'un tissu. Enfin, l'utilisation du carbone 14 chez l'homme, n'est pas autorisée dans tous les pays, notamment en France, en raison de sa période (5730 ans).

3.4.3. La tomographie par émission de positons (TEP)

L'imagerie par émission de positons repose sur les propriétés des émetteurs de rayonnements β^+ ou positons. Les émetteurs de positons produisent deux photons γ de 511 keV, émis à 180 degrés l'un de l'autre par annihilation, après rencontre avec un électron de la matière. L'imagerie TEP est basée sur la co-détection simultanée de ces deux photons. Dans le cadre de l'étude du transport du glucose, le traceur utilisé en TEP est le [18F]-2- fluoro-2-déoxy-D-glucose ou FDG. Le FDG est un analogue du 2-déoxy-D-glucose qui, transporté à l'intérieur de la cellule par diffusion facilitée comme le glucose via les GLUTs, est ensuite phosphorylé en position 6 par l'hexokinase pour donner du fluoro-2-DG-6-phosphate. Celui-ci, n'étant ni métabolisé ni déphosphorylé, est piégé dans la cellule et s'y accumule, permettant ainsi la visualisation du tissu par imagerie TEP. Le transport et la phosphorylation du FDG sont estimés à partir d'un modèle mathématique à trois compartiments (figure 1). Ce traceur est principalement utilisé pour la détection de tumeurs cancéreuses. La résolution spatiale de la TEP fournit un grand nombre de régions d'intérêt de petit volume dans lesquelles l'homogénéité du métabolisme est bonne.

Limites : L'activité émise par le ^{18}F provient à fois du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ et du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG-6-phosphate}$, ce qui, malgré le processus de modélisation, biaise l'estimation du transport du glucose. La principale limite de cette approche est que la quantification du métabolisme du glucose nécessite la connaissance d'un facteur correctif, un facteur qui concerne le comportement cinétique du FDG par rapport au glucose naturel en termes d'affinité relative de chaque molécule pour le transporteur trans-sarcolemmique et pour hexokinase. Malheureusement, la valeur de ce facteur correctif chez l'homme dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques varie, et l'imagerie TEP doit être réalisée avec une normalisation des conditions métaboliques, c'est à dire sous clamp euglycémique hyperinsulinémique.

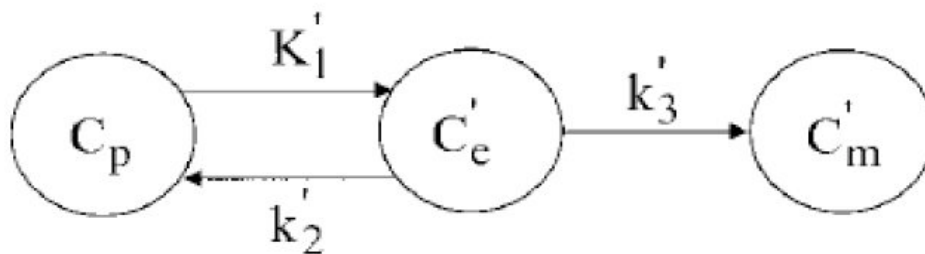


Figure 1. Modélisation à trois compartiments du transport et du métabolisme du FDG. C_p représente le compartiment plasmatique, C_e' représente le compartiment intracellulaire et C_m' représente la concentration de FDG phosphorylé. Les constantes cinétiques du traceur (K_1' , k_2' et k_3') permettent de quantifier les échanges du traceur entre chaque compartiment (Bertoldo, 2001).

Le 3-O-méthyl-D-glucose (3OMG) est également utilisé en TEP. Le 3OMG n'est utilisable in vivo que marqué par du carbone 11, ce qui a été fait dans certains travaux portant sur le métabolisme cérébral (Feinendegen, 1986). Il a également été utilisé pour l'étude du transport du glucose dans le muscle squelettique chez l'homme (Bertoldo, 2005). L'analyse des données

requiert, comme pour le FDG, une modélisation du transport à l'aide d'un modèle à trois compartiments (figure 2).

Limites : Le carbone 11 présente une période de 20 minutes, ce qui empêche son utilisation en routine clinique.

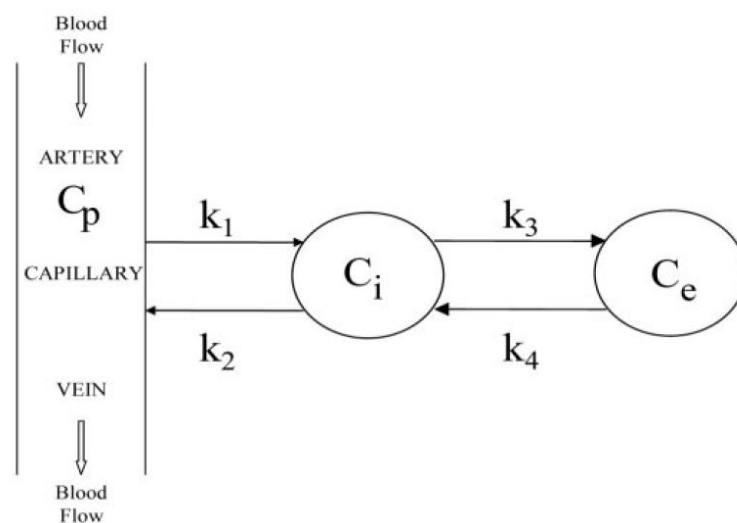


Figure 2. Modélisation à trois compartiments du transport du 3OMG. C_p représente le compartiment plasmatique, C_i représente le compartiment interstitiel et C_e représente le compartiment intracellulaire. Les constantes cinétiques du traceur (k_1 , k_2 , k_3 et k_4) permettent de quantifier les échanges du traceur entre chaque compartiment (Bertoldo, 2005).

5. Conclusion et intérêt de la mesure de l'insulino-résistance :

L'insulino-résistance est donc un phénomène précoce et important dans la pathogénèse de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type 2. Elle joue aussi un rôle dans l'insuffisance cardiaque au travers du métabolisme cardiaque. Elle représente également un facteur de risque associé aux maladies cardiovasculaires. Son origine est multifactorielle et encore incomplètement connue. Certains traitements peuvent être envisagés afin de diminuer

cette insulino-résistance et surtout d'éviter ou de ralentir ses perturbations ultérieures. Mais pour une meilleure efficacité, ces traitements doivent être prescrits lorsque l'insulino-résistance est détectée. Malgré toutes les méthodes d'évaluation de la sensibilité à l'insuline et du transport du glucose existantes, aucune n'est à l'heure actuelle simple, robuste, reproductible et suffisamment sensible pour une utilisation en routine clinique. Le développement d'une méthode de mesure de l'insulino-résistance applicable en pratique clinique courante paraît donc essentiel.

Etudes pré-cliniques réalisées avec le 6-DIG

1. INTRODUCTION

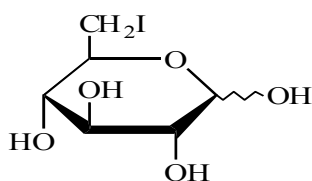
Le 6-DIG, analogue iodé du glucose, a été développé et validé *in vitro* comme traceur pur du transport du glucose. Il est proposé pour l'appréciation *in vivo* de l'insulinorésistance.

La stratégie des essais non cliniques a été d'évaluer la pharmacologie, la pharmacocinétique et la sécurité du 6-[123I]-DIG, en vue de potentielles études chez l'homme. Les premières études pharmacologiques ont été réalisées dans l'objectif de tester si le 6-DIG pouvait être utilisé comme traceur du transport du glucose et s'il était capable d'entrer dans les cellules via le transporteur du glucose. Les études pharmacologiques de sécurité n'ont pas spécifiquement été réalisées. Cependant, la nature du traceur (analogue du glucose) et l'absence de signes au niveau du système nerveux central et du cœur durant l'étude de toxicité aigue réalisée à une dose très supérieure à celle proposée pour l'utilisation chez l'homme, justifie l'absence de ces études.

Les études non cliniques ont été conçues pour tester la biodistribution, la dosimétrie et le métabolisme du 6-DIG. Enfin, les études de toxicologie ont inclu à la fois une étude de toxicologie aiguë par voie intraveineuse chez les rats et l'analyse de génotoxicité *in vitro* (Test d'Ames).

2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES, BIOLOGIQUES ET FORMULATION

La formule chimique du traceur est C₆H₁₁O₅I et sa structure chimique est représentée figure 3.



6-DIG

Figure 3: Structure chimique 6-[123I]-DIG Poids moléculaire (g/mol): 290,05

2.1 LA PURETE CHIMIQUE ET RADIOCHIMIQUE

Le 6-[123I]-DIG est obtenu extemporanément par échange isotopique entre l'127I et l'123I.

L'analyse du processus de fabrication du 6-[123I]-DIG permet d'identifier les substances potentiellement présentes dans les doses qui seront injectées au patient en même temps que le médicament radiopharmaceutique 6-[123I]-DIG. Le fabricant a recherché ces substances dans les lots de validation décrits dans la partie pharmaceutique, appliquant des méthodes d'analyse validées respectant les spécifications de la pharmacopée européenne.

2.2 ANALYSE DE LA TOXICITE POTENTIELLE DES CONSTITUANTS

Le 6-[123I]-DIG est une solution aqueuse isotonique, préparée pour l'injection intraveineuse.

Cependant, le procédé de production du 6-[123I]-DIG exige l'utilisation de composés organiques ou/et de solvants pour lesquels les quantités doivent être contrôlées dans la solution injectable. Ces composants sont rapportés ci-dessous.

Nature du solvant	Spécifications (ppm)
Acétone	≤ 500

Figure 4: solvants résiduels (contrôlés par chromatographie en phase gazeuse Head Space) contrôlés sur les trois lots de validation réalisés pour le DME 1.

L'acétone, un solvant de classe 3 selon les recommandations de l'EMA (directive Q3C de l'ICH relative aux solvants résiduels, 1997), doit être limitée à la concentration la plus basse possible.

2.3 IMPURETE DE SYNTHESE

Aucun sous-produit de synthèse n'a été observé en grande quantité lors de la synthèse.

2.4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le 6-[123I]-DIG est obtenu extemporanément par échange isotopique. Le procédé de production du 6-[123I]-DIG exige l'utilisation d'acétone. Sa quantité résiduelle, dans la solution injectable, est inférieure à 500 ppm, conformément aux lignes directrices ICH Q3C relatives aux solvants résiduels. Aucun sous-produit de synthèse n'a été observé en grande quantité lors de la synthèse.

3. PHARMACOLOGIE NON CLINIQUE

3.1 Pharmacologie primaire

Henry *et al.* (1997) a examiné les effets pharmacologiques du 6-DIG afin d'évaluer s'il pouvait être employé pour apprécier le transport de glucose par SPECT ([Henry, 1997](#)). Pour établir si le 6-DIG entre dans les cellules en utilisant le transporteur de glucose, trois modèles biologiques *in vitro* et un modèle *in vivo* ont été employés: érythrocytes humains en suspension, cardiomyocytes de rats nouveaux-nés en culture, cœurs isolés perfusés de rat et biodistribution chez les souris. L'étude a montré que le 6-DIG entrait en compétition avec le D-glucose pour pénétrer dans les cellules ; son entrée était augmentée par l'insuline et inhibée en présence de cytochalasine B ([figures 5, 6, 7](#)).

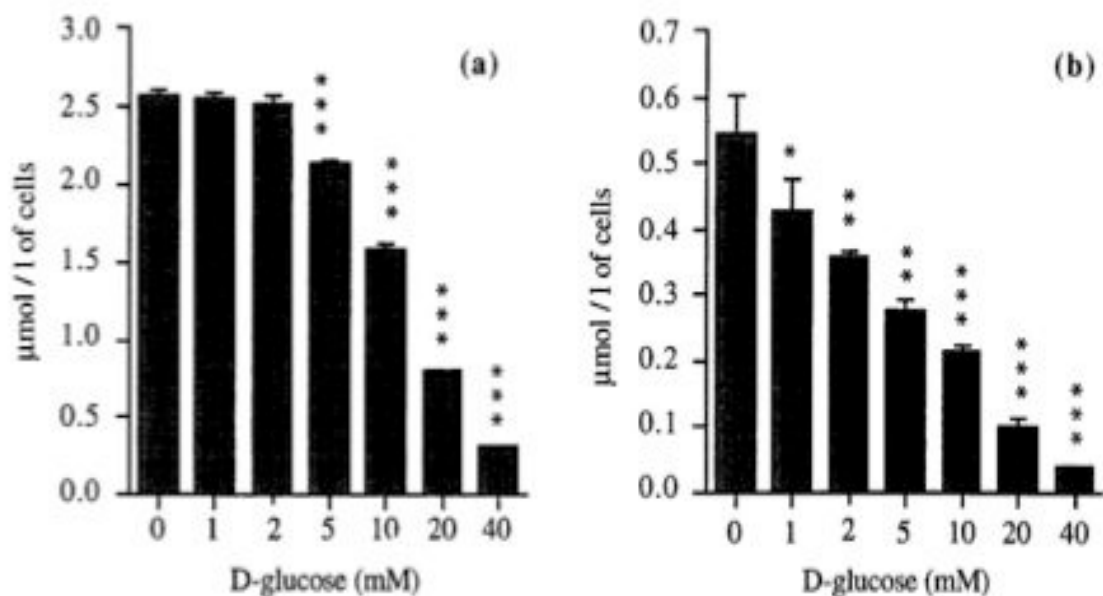


Figure 5 : Effets de la concentration de D-glucose sur l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les érythrocytes en suspension à 4°C. Moyenne $\pm$ écart-type (n = 3 pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs mesurées en l'absence de D-glucose : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

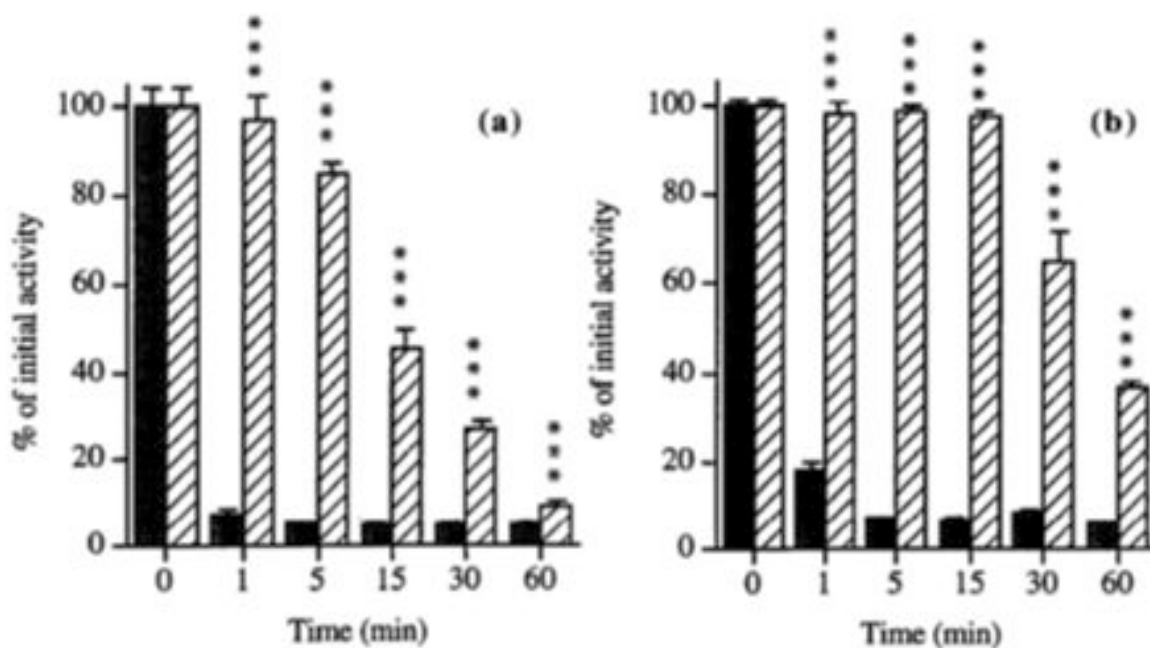


Figure 6 : Cinétiques d'élimination du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les érythrocytes en suspension à 25°C. ■ contrôle, ▨ cytochalasine B (50 μM). Moyenne $\pm$ écart-type (n = 3 pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles mesurées : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

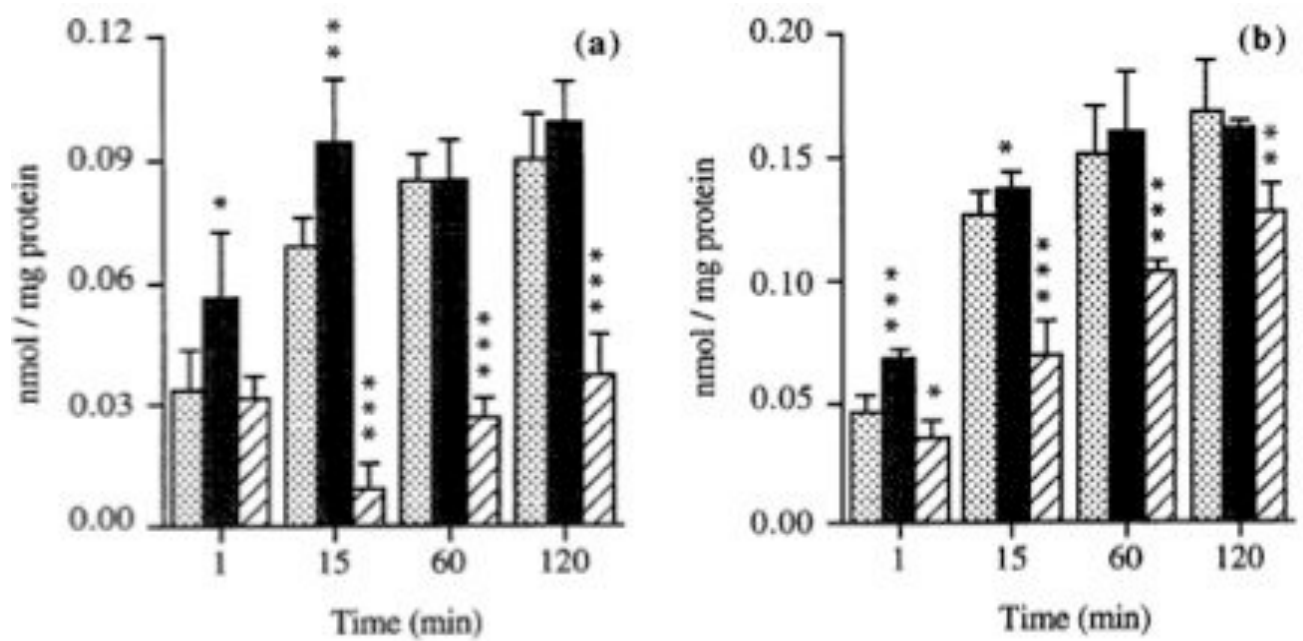


Figure 7 : Evolution au cours du temps de l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. ▨ contrôle, ▨ insuline (100 UI/l), ▨ cytochalasine B (50μM). Moyenne ± écart-type (n = 6 pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles mesurées : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

L'étude a permis de mettre en évidence que le comportement biologique du 6-DIG était semblable à celui du 3-OMG (figures 8 et 9, tableaux 1, 2 et 3).

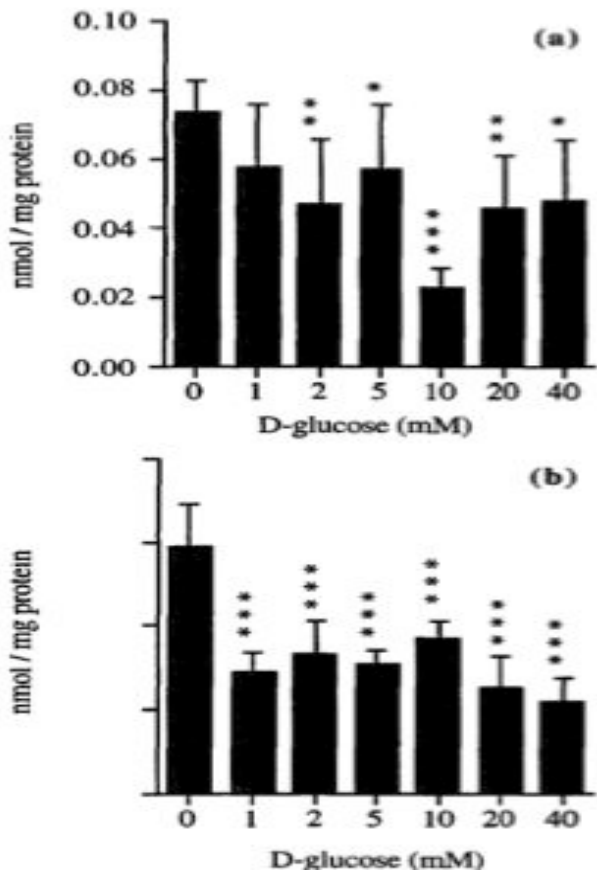


Figure 8

Figure 8 : Effets des concentrations de D-glucose sur l'absorption du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. Moyenne $\pm$ écart- type (n = 6 pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs mesurées en l'absence de D-glucose : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

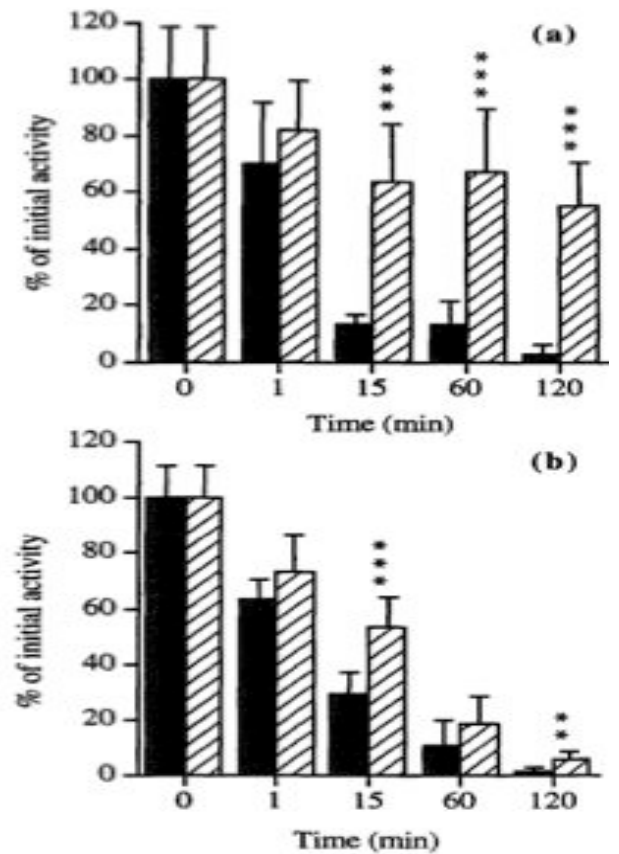


Figure 9

Figure 9: Cinétiques d'élimination du 3-OMG (a) et du 6-DIG (b) par les cardiomyocytes en culture de rats néonataux. ■ contrôle, ▨ cytochalasine B (50 μ M). Moyenne $\pm$ écart-type (n = 6 pour chaque point de temps). Comparaison avec les valeurs contrôles: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Time (min)	3-OMG			6DIG		
	Control (n = 3)	Insulin (n = 3)	Phloretin (n = 3)	Control (n = 5)	Insulin (n = 5)	Phloretin (n = 5)
1	0.79 ± 0.05	1.06 ± 0.08**	0.41 ± 0.04***	2.67 ± 0.63	2.52 ± 0.78	1.24 ± 0.26**
2	0.30 ± 0.10	0.20 ± 0.03	0.34 ± 0.05	1.08 ± 0.15	0.57 ± 0.18**	0.72 ± 0.20*
5	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01*	0.21 ± 0.03**	0.26 ± 0.06	0.10 ± 0.02**	0.34 ± 0.05

Values were compared to the control values: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
Results are expressed as % of the injected dose/g. Mean ± SD (n = number of experiments).

Tableau 1: Evolution au cours du temps de l'activité du 3-OMG et du 6-DIG dans des cœurs isolés de rats perfusés avec du D-glucose libre.

Time (min)	Heart	Liver	Lungs	Kidneys	Brain	Blood
2	1.89 ± 0.22	3.96 ± 0.54	†2.74 ± 0.33	9.47 ± 1.16	2.16 ± 0.51	6.67 ± 1.37
5	1.45 ± 0.12**	3.11 ± 0.57*	2.02 ± 0.28**	10.45 ± 5.68	1.08 ± 0.70*	5.09 ± 1.21
10	1.37 ± 0.12***	3.12 ± 0.39*	1.83 ± 0.59*	8.84 ± 2.16	1.54 ± 0.60	5.02 ± 1.51
15	0.97 ± 0.11***	2.20 ± 0.38***	1.48 ± 0.42**	‡4.32 ± 0.62***	0.79 ± 0.42***	‡4.35 ± 1.47*
60	0.39 ± 0.10***	1.05 ± 0.15***	0.66 ± 0.10***	1.07 ± 0.36***	0.29 ± 0.13***	‡3.23 ± 0.90***

Each value was compared to that obtained 2 minutes p.i.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
Mean ± SD (n = 6 for each point, except † n = 4 and ‡ n = 5). Results are expressed as % of the injected dose per gram of organ or per millilitre of blood.

Tableau 2: Biodistribution du 3-OMG chez la souris.

Time (min)	Heart	Liver	Lungs	Kidneys	Brain	Blood
2	7.97 ± 0.18	11.10 ± 0.51	7.80 ± 0.49	8.97 ± 0.68	2.70 ± 0.14	11.90 ± 0.10
5	7.00 ± 0.77*	9.57 ± 0.50*	8.30 ± 0.57	6.97 ± 0.54**	3.53 ± 0.33*	10.20 ± 0.60
10	6.99 ± 0.62*	8.50 ± 0.64*	7.37 ± 0.66	6.90 ± 0.59**	3.97 ± 0.57*	7.53 ± 0.28**
15	6.25 ± 1.14*	6.60 ± 0.22***	6.40 ± 0.14*	6.27 ± 0.41**	3.80 ± 0.25**	7.48 ± 0.53*
60	3.78 ± 1.04***	3.67 ± 0.39***	3.90 ± 0.37***	3.77 ± 0.33***	2.40 ± 0.16	4.90 ± 0.60**

Each value was compared to that obtained 2 minutes p.i.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
Mean ± SD (n = 5 for the heart and n = 3 for the other organs). Results are expressed as % of the injected dose per gram of organ or per millilitre of blood.

Tableau 3: Biodistribution du 6-DIG chez la souris.

Cette étude a permis de mettre en évidence que le 6-DIG est un traceur pur du transport du glucose.

L'état pré-diabétique est caractérisé par un état d'insulinorésistance, autrement dit un défaut de transport du glucose dans les tissus insulinosensibles, tels que les muscles et le tissu adipeux. Dans ce contexte, la même équipe a démontré que le 6-DIG était rapidement capté par les adipocytes et que l'insuline augmentait le transport du 6-DIG dans les adipocytes isolés de rats et de souris (figure 10) (Henry, 1997).

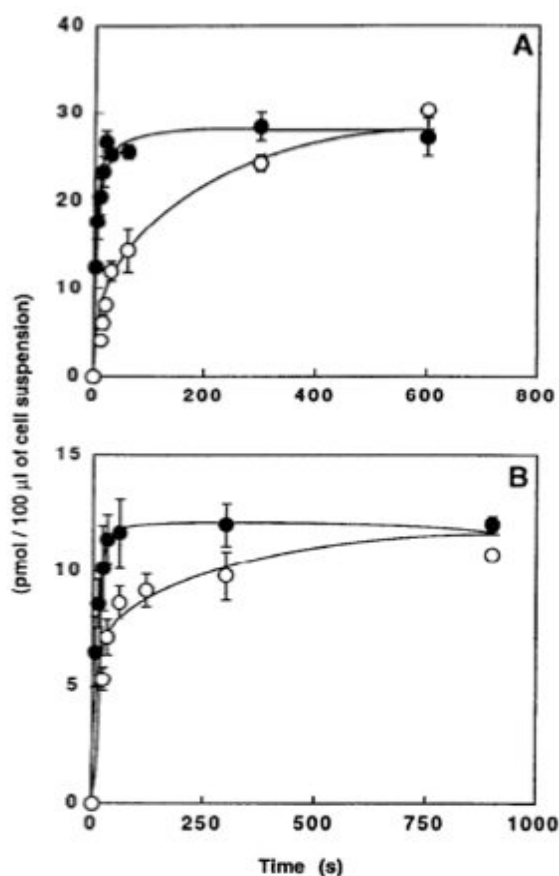


Figure 10. Evolution au cours du temps de l'entrée du 6-DIG dans les adipocytes. L'entrée du 6-DIG a été mesurée dans des adipocytes isolés provenant de la graisse épididymale de rats (A) ou de souris (B). Les adipocytes isolés ont été incubés en l'absence (○) ou en présence de 100nmol/l d'insuline (●) pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4). L'entrée fut initiée par l'addition de 6-DIG (2 µCi par essai, concentration finale de 1 mmol/l). Les résultats sont exprimés en pmol/100µl de cellules en suspension. Chaque valeur est la moyenne ± ESM des trois expériences.

Cette stimulation était plus importante dans les adipocytes des rats que dans ceux des souris, ce qui est en accord avec leur quantité respective de transporteurs Glut 4 (tableau 4).

	Glut 4 (arbitrary unit)	Initial rate of 6-DIG transport (pmol/min/100 μ l of cell suspension)		
		Basal	Insulin	Fold stimulation
Rat	100	19.3 $\pm$ 2.6	202.5 $\pm$ 21.7	11.4 $\pm$ 1.7
Mice	40.1 $\pm$ 7.3	13.4 $\pm$ 1.1	50.6 $\pm$ 4.2	3.9 $\pm$ 0.4

Adipocytes were prepared from normal rats or mice and incubated for 30 minutes in the absence (basal) or in the presence of insulin (100 nmol/l). Uptake was initiated by the addition of 6-DIG (2 μ Ci, 0.1 mmol/l final). Uptake was stopped as described in Methods after 30 s for untreated cells and after 3 or 5 s for insulin-treated cells isolated from rats or mice, respectively. Glut 4 amount was determined by immunodetection. Total adipocyte proteins (80 μ g) were separated by SDS/PAGE and immunoblotted with antibody to Glut 4 as described in methods and the amounts of Glut 4 were quantified by scanning. To allow for comparison amongst experiments, results were expressed relative to the amount of Glut 4 transporter present in rat cells. All results are expressed as the means $\pm$ SE of 3 (Glut 4 immunodetection), 6–8 (6-DIG uptake) experiments.

Tableau 4 : Comparaison de la quantité totale de Glut 4 et du taux initial de transport du 6-DIG dans les adipocytes de rats et de souris.

En outre, que ce soit à l'état basal ou stimulé par l'insuline, le comportement biologique du 6-DIG et du 3-OMG étaient semblables (figures 11, 12).

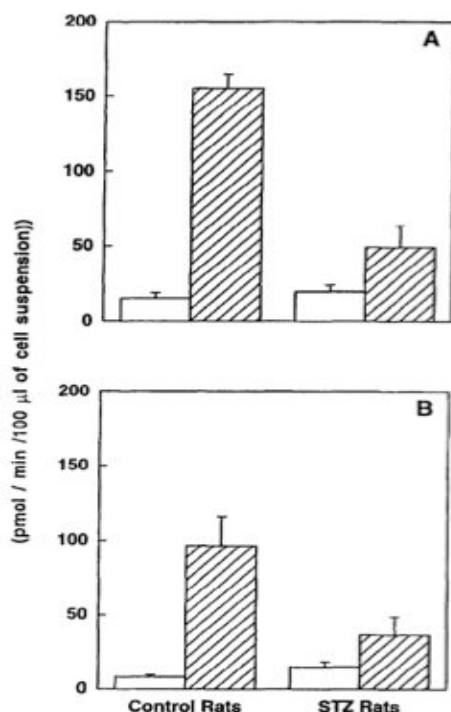


Figure 11: Comparaison du transport du 6-DIG (A) et du 3-OMG (B) dans des adipocytes isolés provenant de rats contrôles et de rats STZ. Les adipocytes isolés ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4) en l'absence (barre blanche) et en présence (barre hachurée) de 100nmol/l d'insuline. A la fin de l'incubation, l'entrée a été initiée par l'addition de 6-DIG (0.1mmol/l, 2 μ Ci par essai) ou de 3-OMG (0.1mmol/l, 0.8 μ Ci par essai). Le transport du 6-DIG et du 3-OMG a été stoppé après 30 secondes de condition basale et après 3 ou 20 secondes pour les cellules traitées à l'insuline provenant respectivement des rats contrôles et diabétiques. Les résultats sont exprimés en pmol/min/100 μ l de cellules en suspension. Les valeurs présentées sont les moyennes $\pm$ ESM des trois expériences.

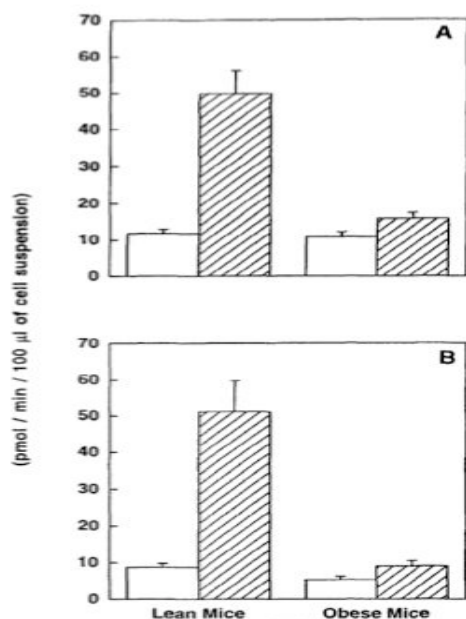


Figure 12 : Comparaison du transport du 6-DIG (A) et du 3-OMG (B) dans des adipocytes isolés provenant de souris contrôles ou rendues obèses par thioglucose d'or. Les adipocytes isolés ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon KRBH, 1% BSA (pH 7.4) en l'absence (barre blanche) et en présence (barre hachurée) de 100nmol/l d'insuline. A la fin de l'incubation, l'entrée a été initiée par l'addition de 6-DIG (0.1mmol/l, 2μCi par essai) ou de 3-OMG (0.1mmol/l, 0.8μCi par essai). Le transport du 6-DIG et du 3-OMG a été stoppé après 30 secondes de condition basale et après 5 ou 20 secondes pour les cellules traitées à l'insuline provenant respectivement des souris minces et obèses. Les résultats sont exprimés en pmol/min/100μl de cellules en suspension. Les valeurs présentées sont les moyennes ± ESM des trois expériences.

Ces résultats indiquent que le 6-DIG, qui a été transporté dans les cellules par l'intermédiaire des transporteurs du glucose, pourrait être potentiellement utile pour mesurer des modifications dans le transport du glucose.

Malaisse *et al.* (2000) a comparé le devenir du 6-[125I]-DIG injecté par voie intraveineuse, chez des rats contrôles, et chez des animaux ayant reçu de la streptozotocine et qui étaient ensuite traités ou non par insuline (Malaisse, 2000). Chez les rats contrôles, la mesure de la radioactivité plasmatique suggère que, après une initiale et rapide (jusqu'à 10 minutes) phase de distribution (volume de distribution proche de la masse corporelle totale), la clairance de l'hexose iodé s'est produite principalement par filtration glomérulaire. Trois minutes après l'injection du 6-DIG, la teneur radioactive des muscles, foie, pancréas, appariée sur les valeurs sanguines, était plus faible chez les rats diabétiques non traités par insuline que chez des animaux témoins (tableau 5).

Biological Data in Either Control Animals or STZ Rats, Treated with Insulin or Not,
and Examined 3 or 10 min after the Injection of 6-DIG

Rats	Control	STZ	STZ + insulin
Body weight (g)	196 ± 3 (24)	173 ± 6 (24)	183 ± 5 (12)
Plasma D-glucose concentration (mM)	10.2 ± 0.2 (24)	25.7 ± 0.8 (24)	6.7 ± 0.8 (12)
Muscle/blood radioactive ratio (%)			
min 3	20.2 ± 2.1 (6)	13.1 ± 0.9 (6)	16.3 ± 1.4 (6)
min 10	21.7 ± 1.8 (6)	22.4 ± 3.0 (6)	24.6 ± 0.9 (5)
Liver wet wt			
g	6.50 ± 0.15 (24)	6.05 ± 0.19 (24)	9.30 ± 0.27 (12)
% of body wt	3.35 ± 0.07 (24)	3.50 ± 0.08 (24)	5.09 ± 0.28 (12)
Liver/blood radioactive ratio (%)			
min 3	116.1 ± 15.1 (12)	85.8 ± 4.7 (11)	90.4 ± 13.2 (6)
min 10	202.7 ± 11.7 (12)	149.1 ± 8.8 (11)	172.1 ± 5.6 (6)
Pancreas wet wt			
mg	728 ± 20 (24)	668 ± 24 (24)	765 ± 46 (12)
% of body wt	3.70 ± 0.10 (24)	3.88 ± 0.15 (24)	4.11 ± 0.28 (12)
Pancreas/blood radioactive ratio (%)			
min 3	41.0 ± 3.2 (11)	27.0 ± 1.0 (11)	30.6 ± 1.5 (6)
min 10	50.4 ± 3.1 (12)	57.0 ± 4.4 (11)	57.8 ± 3.9 (6)

Tableau 5

Dans le cas du muscle et du foie, une telle différence n'est plus observée lorsque le traitement des rats diabétiques par insuline a eu comme conséquence la restauration de la normoglycémie. Cependant, dans le pancréas la radioactivité, lorsqu'elle est exprimée de façon relative à la valeur dans le sang ou le foie, demeure sensiblement plus faible chez les rats diabétiques traités par insuline que chez les animaux témoins. Aucune différence significative n'a été observée, entre les rats diabétiques et les rats contrôles, en terme de radioactivité pancréatique 10 minutes après l'injection du 6-DIG. La différence au cours du temps dans la captation du 6-DIG par les acinis et les îlots pancréatiques résulte, 3 minutes après l'injection intraveineuse de 6-DIG, en une plus importante captation pancréatique de l'hexose iodé par l'intégralité de la glande pancréatique des rats contrôles, ce qui est différent

des animaux devenus diabétiques en raison de la destruction des cellules insulino-productrices par streptozotocine. Cette différence a également été observée en comparant des rats contrôles aux animaux diabétiques ayant une concentration moyenne de D-glucose plasmatique normale, du fait d'un traitement par insuline. Ces résultats indiquent que l'on peut tirer profit du délai important qui existe pour la captation du 6-DIG par les acinis et les îlots pancréatiques pour marquer préférentiellement la partie endocrinienne de la glande pancréatique peu de temps après l'injection de 6-DIG.

La capacité du 6-[125 I]-DIG à évaluer les variations de transport du glucose a également été étudiée *in vivo* par Perret *et al.* (2003). La biodistribution du 6-[125I]-DIG a été évaluée, avec ou sans insuline exogène, chez des souris contrôles non-diabétiques (*db/+*) et chez des souris diabétiques de type 2 (*db/db*) montrant une importante résistance à l'insuline caractérisée par un manque d'augmentation de la captation du glucose en réponse à l'insuline. Chez les souris *db/+*, l'insuline augmente de 30 % le transport du 6-[125I]-DIG dans la plupart des tissus insulinosensibles (cœur, diaphragme et muscle squelettique, $p < 0.05$) et n'a aucun effet dans les autres organes (tableau 6, figure 13).

Time (min)	Muscle		Diaphragm		Heart		Fat	
	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin
2	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.11	0.83 ± 0.12	0.86 ± 0.10	0.91 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.02
5	0.55 ± 0.06	0.81 ± 0.13 ^c	0.81 ± 0.08	1.14 ± 0.16 ^c	0.83 ± 0.10	1.16 ± 0.08 ^d	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.03
10 ^a	0.58 ± 0.13	0.85 ± 0.04 ^c	0.84 ± 0.12	0.95 ± 0.23	0.88 ± 0.08	1.07 ± 0.07 ^c	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02
15	0.74 ± 0.06	0.96 ± 0.06 ^d	0.84 ± 0.12	1.06 ± 0.11 ^b	0.95 ± 0.07	1.12 ± 0.06 ^c	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.07

Time (min)	Lungs		Liver		Kidneys	
	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin
2	0.89 ± 0.05	0.90 ± 0.05	1.23 ± 0.06	1.37 ± 0.08 ^b	0.96 ± 0.06	1.02 ± 0.06
5	0.90 ± 0.02	1.07 ± 0.09 ^c	1.11 ± 0.08	1.31 ± 0.12 ^b	0.91 ± 0.06	1.13 ± 0.24
10 ^a	0.94 ± 0.09	1.05 ± 0.05	1.08 ± 0.08	1.11 ± 0.07	0.94 ± 0.07	0.91 ± 0.02
15	1.06 ± 0.04	1.08 ± 0.08	1.13 ± 0.03	1.17 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.06 ± 0.12

*Mean ± SD (n = 6, except ^a: n = 7).
Comparison of basal vs insulin; ^bp < 0.05,
^cp < 0.01,
^dp < 0.001.

Tableau 6 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes et le sang, chez les souris contrôles *db/+*.

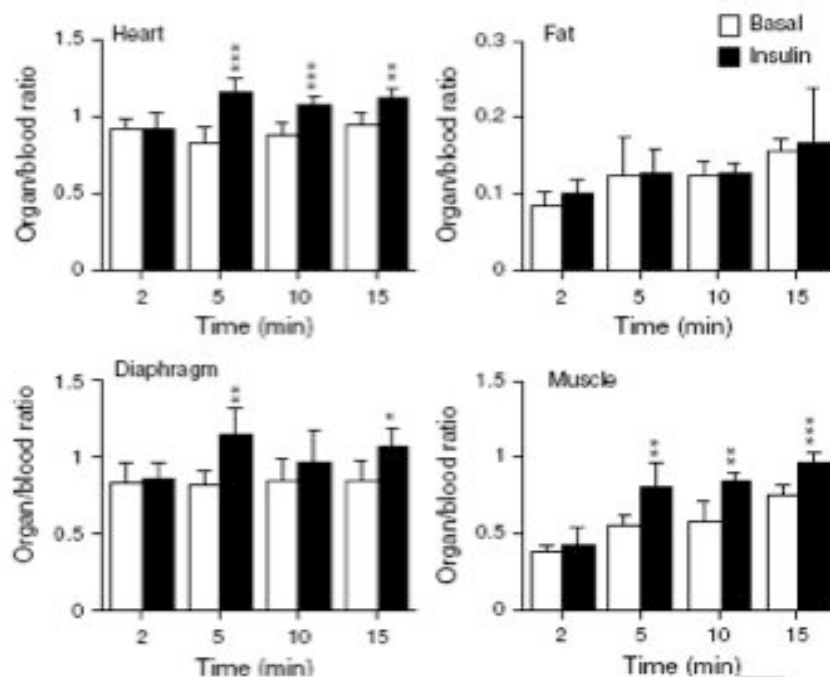


Figure 13 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes insulino- sensibles et dans le sang, chez les souris contrôles *db/+*, avec ou sans injection d'insuline. Moyenne ± écart-type : comparaison à l'état basal versus avec insuline : *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001.

Chez les souris *db/db*, en l'absence d'insuline, les rapports organes/sang dans les 4 organes insulino- sensibles (cœur, muscles, diaphragme et tissu adipeux) ne sont pas significativement différents entre la 2ème et la 15ème minute (tableau 7, figure 14). En présence d'insuline, ces rapports ne sont pas significativement différents de ceux observés dans les conditions basales. Il en est de même pour les autres organes. Chez les souris *db/db*, le transport du [125I]-6-DIG dans ces organes n'a donc pas été modifié par l'insuline.

Time (min)	Muscle		Diaphragm		Heart		Fat	
	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin
2	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.61 ± 0.10	0.58 ± 0.08	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01
5	0.53 ± 0.09	0.52 ± 0.16	0.72 ± 0.12	0.89 ± 0.24	0.72 ± 0.03	0.67 ± 0.16	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02
10	0.57 ± 0.11	0.59 ± 0.06	0.59 ± 0.03	0.79 ± 0.16	0.63 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.10 ± 0.04	0.12 ± 0.02
15	0.55 ± 0.10	0.58 ± 0.05	0.62 ± 0.09	0.70 ± 0.05	0.63 ± 0.10	0.69 ± 0.05	0.13 ± 0.08	0.21 ± 0.15

Time (min)	Lungs		Liver		Kidneys	
	Basal	Insulin	Basal	Insulin	Basal	Insulin
2	0.71 ± 0.05	0.73 ± 0.04	1.03 ± 0.11	1.05 ± 0.07	0.94 ± 0.16	1.13 ± 0.17
5	0.87 ± 0.07	0.82 ± 0.10	1.07 ± 0.05	0.99 ± 0.07	1.35 ± 0.39	1.31 ± 0.29
10	0.85 ± 0.08	0.92 ± 0.07	0.99 ± 0.04	0.97 ± 0.10	1.15 ± 0.19	1.32 ± 0.21
15	0.87 ± 0.07	0.87 ± 0.03	0.91 ± 0.05	0.91 ± 0.07	1.24 ± 0.15	1.14 ± 0.27

*Mean ± SD. Comparison of basal vs insulin: NS for all values.

Tableau 7 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes et le sang, chez les souris diabétiques *db/db*.

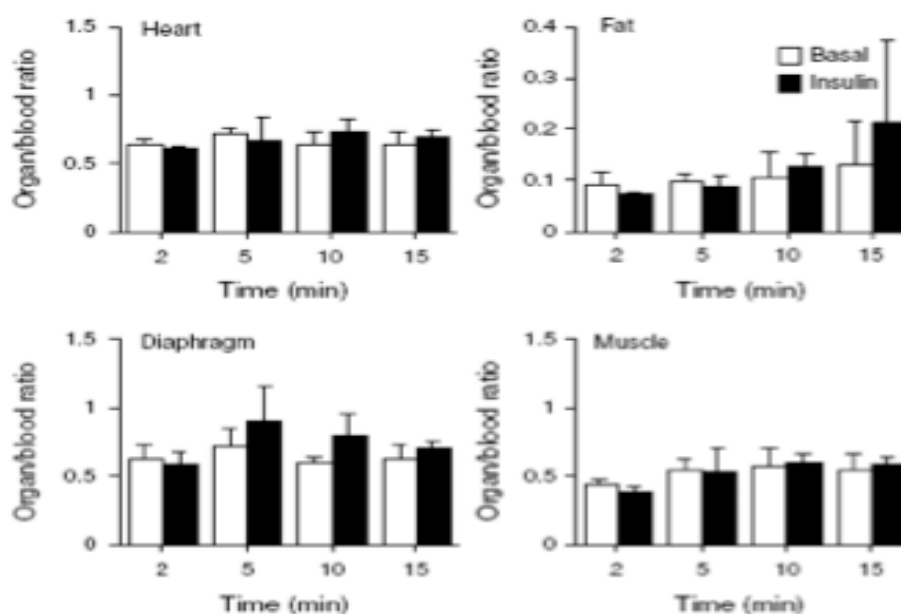


Figure 14 : Rapport des concentrations en [125I]-6-DIG dans les organes insulino- sensibles et dans le sang, chez les souris diabétiques *db/db*, avec ou sans injection d'insuline. Moyenne ± écart-type : comparaison à l'état basal versus avec insuline : NS.

Le 6-[125I]-DIG est donc capable de tracer *in vivo* une augmentation du transport du glucose avec l'insuline chez les souris non-diabétiques et un défaut de transport du glucose chez les souris diabétiques de type 2. Perret *et al.* (2007) a évalué les variations de transport du glucose chez les rats en utilisant le 6-DIG proposé comme outil d'imagerie afin d'évaluer la résistance à l'insuline *in vivo* (Perret, 2007). Deux protocoles ont été réalisés, un clamp euglycémique hyperinsulinémique et un protocole normoglycémique normoinsulinémique, chez des rats contrôles et chez des rats rendus insulino-résistants par un régime enrichi en fructose. Le traceur a été injecté à l'état d'équilibre et l'activité a été évaluée *ex vivo*, dans 11 tissus et dans le sang, à différents temps. Un modèle mathématique multicompartimental a été développé afin d'obtenir les coefficients de transfert fractionnels du 6-DIG du sang vers les différents organes (figures 15).

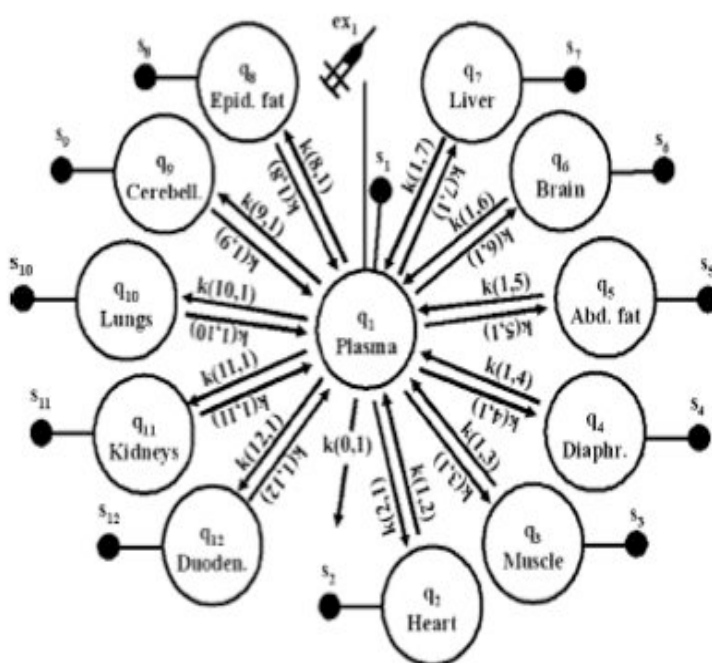


Figure 15: Modèle sélectionné pour l'étude du transport du 6-DIG.

La sensibilité à l'insuline des rats nourris au fructose, estimée par le taux de perfusion de glucose, a été réduite de 40% par rapport aux rats contrôles. A l'état d'équilibre, la captation du 6-DIG a été significativement stimulée par l'insuline dans les tissus insulinosensibles des rats contrôles (basal *versus* insuline : diaphragme, $p < 0.01$; muscle, $p < 0.05$; cœur, $p < 0.001$),

alors que l'insuline n'a pas stimulé la captation du 6-DIG chez les rats rendus insulino-résistants par un régime enrichi en fructose (tableau 8).

	Heart	Diaphragm	Muscle	Abd. fat	Lungs	Blood
Control	$p<0.001$	$p<0.01$	$p<0.05$	NS	NS	NS
Fructose fed	$p<0.05$	NS	NS	$p<0.05$	NS	NS

Tableau 8 : Comparaison des cinétiques du 6-DIG chez des animaux ayant subi un clamp euglycémique hyperinsulinémique *versus* ceux ayant subi un protocole normoglycémique normoinsulinémique, dans les groupes de rats contrôles et de rats rendus insulino-résistants par un régime enrichi en fructose (test ANOVA).

En outre, dans ces tissus, les coefficients de transfert fractionnels d'entrée ont été significativement augmentés avec l'insuline chez des rats contrôles (basal *versus* insuline: diaphragme, $p<0.001$; muscle, $p<0.001$; cœur, $p<0.01$), alors qu'aucun changement significatif n'a été observé chez les rats rendus insulino-résistants par un régime enrichi en fructose (tableau 9).

	Control rats		Fructose-fed rats	
(k_{ij}) (min^{-1})	Sham	Insulin	Sham	Insulin
$(k_{0,1})$ blood	0.329 (18)	0.236 (6)*	0.214 (6)	0.149 (18)*
$(k_{2,1})$ heart	0.003 (13)	0.015 (31)**	0.004 (21)	0.012 (44)
$(k_{1,2})$ heart	0.102 (27)	0.383 (29)*	0.145 (32)	0.364 (46)
$(k_{3,1})$ muscle	0.244 (21)	0.855 (21)***	1.578 (28)	0.918 (11)
$(k_{1,3})$ muscle	0.068 (46)	0.239 (21)**	0.478 (23)	0.188 (20)*
$(k_{4,1})$ diaphr.	0.002 (22)	0.005 (16)***	0.002 (14)	0.002 (33)
$(k_{1,4})$ diaphr.	0.079 (42)	0.217 (17)*	0.128 (16)	0.097 (55)
$(k_{5,1})$ abd. fat	0.003 (15)	0.004 (19)	0.003 (21)	0.012 (132)
$(k_{1,5})$ abd. fat	0.177 (22)	0.287 (18)	0.258 (24)	1.335 (124)
$(k_{10,1})$ lungs	0.009 (29)	0.014 (18)	0.016 (18)	0.012 (21)
$(k_{1,10})$ lungs	0.173 (36)	0.255 (18)	0.280 (18)	0.202 (23)

Values between parentheses represent the precision of estimated parameters ($\hat{p}_i$) expressed as coefficient of variation (in percentage), CV: $(\sqrt{\text{var}(\hat{p}_i)}/(\hat{p}_i)) \times 100$.

Comparison of sham vs insulin: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

Tableau 9 : coefficients de transfert fractionnel (k_{ij}) obtenus à partir du modèle mathématique.

Cette étude montre qu'il est possible d'identifier les variations de transport du glucose *in vivo* dans le modèle animal pré-diabétique en utilisant le 6-DIG, traceur du transport du glucose. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation du 6-DIG en tant que moyen non invasif d'évaluation de la résistance d'insuline par imagerie nucléaire.

Le même type d'étude a été réalisée par l'UMR « Radiopharmaceutiques Biocliniques » avec d'autres modèles physiopathologiques et en détection externe (Briat., 2007). La cinétique du 6-DIG a été étudiée dans trois modèles de rats contrôles ou insulino-résistants : les rats Wistar (contrôles), Zucker (obèses) et ZDF (diabétiques). L'activité myocardique du 6-DIG a été évaluée dans deux conditions: le 6-DIG a d'abord été injecté en condition basale, puis après un bolus d'insuline.

Après chaque injection, la radioactivité a été mesurée pendant plus de 45 minutes par détection externe par l'intermédiaire de sondes NaI (iodure de sodium), dans le cœur et le sang (figure 16).

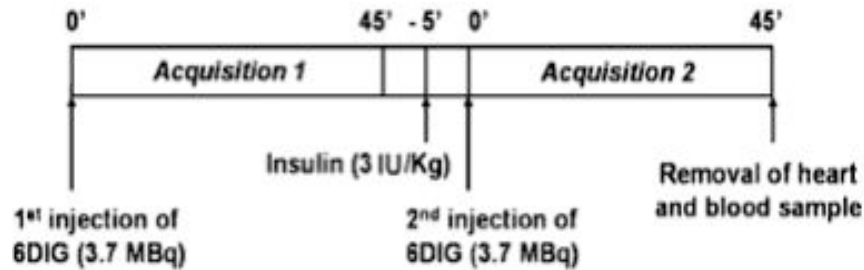


Figure 16 : Protocole expérimental. Les rats ont reçu une première injection de 6- DIG.

La radioactivité a ensuite été mesurée dans le cœur et dans le sang en utilisant deux sondes et enregistrée pendant 45 minutes. Les rats ont ensuite reçu une seconde injection de traceur, 5 minutes après une injection d'insuline (3,0 UI/kg). La radioactivité a été de nouveau mesurée pendant 45 minutes. A la fin de la procédure, le débit sanguin artériel a été mesuré en collectant le sang par un cathéter artériel. Les rats étaient ensuite euthanasiés par injection intraveineuse d'une dose létale de pentobarbital de sodium. Le cœur était rapidement prélevé pour peser et mesure de la radioactivité.

Un modèle tri-compartmental a été développé pour obtenir les coefficients de transfert fractionnels du 6-DIG du sang vers le cœur (figure 17).

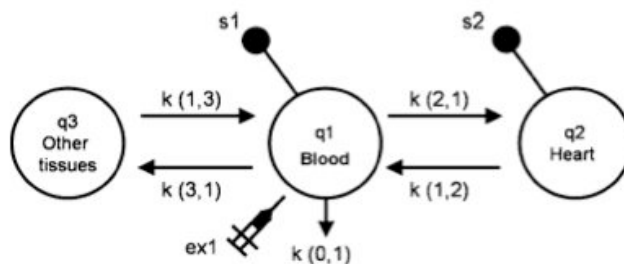


Figure 17 : Modèle tri-compartmental proposé pour l'étude du transport du 6-DIG dans le cœur. Le compartiment central représente le sang (q_1), où le traceur était injecté (ex_1) et d'où un transfert irréversible se fait, représentée par le coefficient $k(0,1)$. Ce compartiment a une

élimination linéaire et bidirectionnelle, dans deux autres compartiments qui sont représentés par le cœur (q_2) et par le reste du corps (q_3). Ces échanges entre les différents compartiments sont représentés par les coefficients k , $s_1 = q_1/V$, avec V représentant le volume sanguin total et $s_2 = q_2/M$, avec M représentant la masse du cœur.

Parmi les différents coefficients de transfert calculés avec les rats Wistar, Zucker et ZDF, $k(2,1)$ est celui qui distingue le mieux les groupes contrôles des groupes de rats insulino-résistants. Les valeurs moyennes de ces coefficients ont ensuite été utilisées pour calculer le ratio $k(2,1)_{insuline} / k(2,1)_{basal}$. Les ratios obtenus pour les différents groupes sont décrits dans le [tableau 10](#).

	Control	Insulin-resistant
Wistar	2.28±0.18	1.16±0.06***
Zucker	1.62±0.25	0.92±0.05**
ZDF	2.01±0.26	1.34±0.06*

$k(2,1)$ ratios are represented as mean±SEM
 Comparison of insulin-resistant rats versus control rats (Mann-Whitney test): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tableau 10 : Rapports (insuline/basal) des coefficients représentant le transfert du 6-DIG depuis le sang vers le cœur.

Ces coefficients ont été sensiblement augmentés avec l'insuline chez les rats contrôles et n'ont pas changé de manière significative chez les rats insulino-résistants. Le rapport du coefficient obtenu après bolus d'insuline avec celui obtenu dans les conditions de base a donné un index d'insulino-résistance cardiaque pour chaque animal. Les valeurs moyennes de ces rapports étaient significativement inférieures chez les rats insulino-résistants comparées aux rats contrôles. Les résultats identifient un défaut de stimulation du transport du 6-DIG dans le cœur chez les rats insulino-résistants, en comparaison aux groupes contrôles. Le 6-DIG

pourrait donc être un traceur utile pour visualiser l'insulinorésistance au niveau cardiaque.

L'équipe INSERM U-1039 a ensuite réalisé une étude ayant pour objectif d'adapter la méthode de mesure de l'insulinorésistance cardiaque avec le 6-DIG pour le muscle squelettique (données non publiées). En effet, le muscle squelettique constitue l'organe insulinosensible le plus important de l'organisme, représentant près de 80% de la captation du glucose sous insuline (DeFronzo, 1981). Contrairement à ce qui peut être réalisé chez l'homme, il n'est pas possible, chez le rat, d'obtenir les cinétiques cardiaque et musculaire simultanément, du fait du champ de vue réduit de la caméra. La radioactivité tissulaire a été enregistrée en fonction du temps, à l'aide d'une sonde NaI positionnée sur la patte du rat (au contact du quadriceps). Le 6-DIG ayant une cinétique plus lente dans le muscle squelettique que dans le myocarde, les périodes d'acquisition ont été plus longues. Le schéma du protocole expérimental était proche de celui développé par Briat *et al.*, avec deux injections de 6-DIG et un bolus d'insuline (Briat, 2007). Dans un premier temps, de nombreux prélèvements sanguins ont été effectués, à 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, 1 min, 1 min 30, 2 min, 2 min 30, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min et 90 min post injection, lors de chaque acquisition afin d'obtenir la cinétique sanguine du traceur et de développer un modèle mathématique adapté. Les données ont été traitées à l'aide d'un modèle mathématique à trois compartiments (Figure. 16): sanguin, interstitiel et intracellulaire. Ce modèle dérive de celui de Bertoldo *et al.*, utilisé pour l'étude du transport du [11C]-3-OMG sous clamp euglycémique hyperinsulinémique, chez l'homme (Bertoldo, 2005).

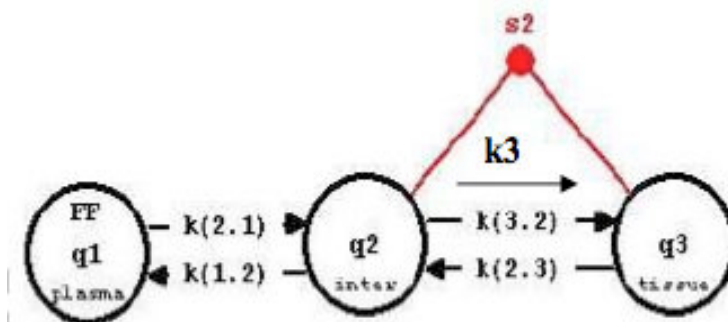


Figure 18 : Modèle à 3 compartiments.

Ce modèle a été adapté au protocole en deux temps avec bolus d'insuline afin d'obtenir les différentes constantes du modèle. La constante $k(3.2)$ ou $k3$ représente l'entrée du traceur dans le muscle squelettique (Figure 19).

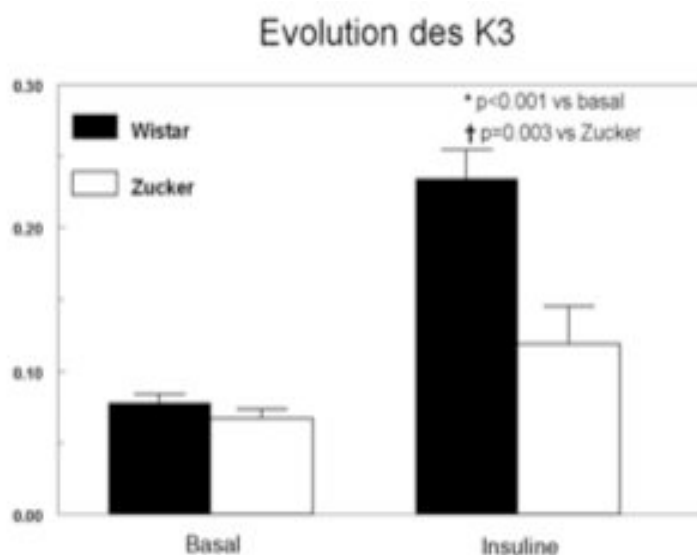


Figure 19 : Evolution du $k3$ chez des rats témoins (noir) et des rats obèses (blanc) entre la condition basale et après le bolus d'insuline. Dans le groupe de rats témoins Wistar, $k3$ augmente significativement sous insuline ($p<0,001$). Par contre, dans le groupe de rats Zucker, insulino-résistants, on n'observe aucune augmentation significative du $k3$ sous insuline ($p=0,131$).

Comme pour le cœur, le rapport de ces constantes d'entrée ($k3$ insuline / $k3$ basal) est utilisé comme index d'insulinorésistance musculaire. Cependant, des études de stabilité des constantes cinétiques du modèle ont montré que ces constantes ne sont pas identifiées avant 90 minutes tant pour la condition basale que pour la condition insuline. Un descripteur empirique a donc été développé, par méthode graphique. Cette mesure étant établie d'après les courbes des cinétiques musculaires aux temps courts, elle permet d'obtenir un index discriminant nécessitant seulement deux fois 20 minutes d'acquisition. L'index obtenu par

cette méthode graphique est corrélée à l'index obtenu par modélisation (coefficient de corrélation $r^2=0,64$; significativité $p<0,0001$), et permet de séparer significativement les rats Wistar des rats Zucker (données non publiées, [Figure 20](#)).

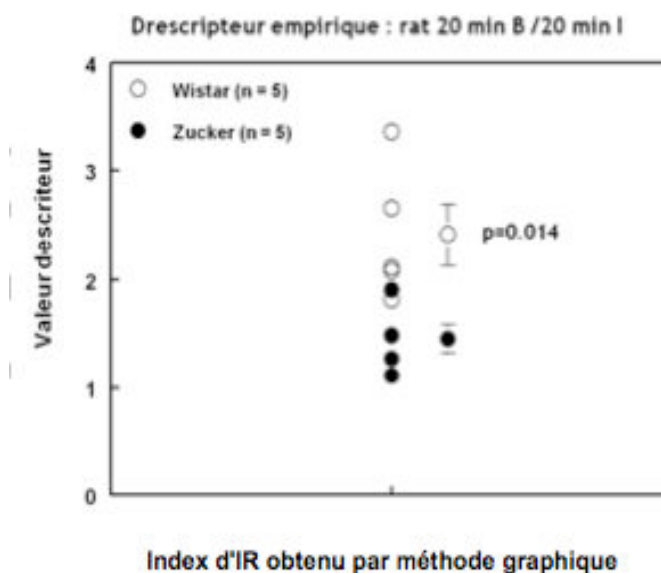


Figure 20 : Cet index d'insulinorésistance musculaire obtenu par méthode graphique permet de séparer significativement les rats Wistar des rats Zucker ($p=0,014$).

Enfin, un protocole de mesure simultanée de l'insulinorésistance cardiaque et musculaire avec le 6-DIG a été mené par la même équipe. Il a consisté en une double injection de 6DIG, suivie chacune d'une acquisition de la radioactivité pendant 20 minutes, l'une est réalisée en conditions basales et l'autre 5 minutes après un bolus d'insuline (2,5 UI/kg). L'activité cardiaque a été obtenue à l'aide de la γ - caméra et l'activité musculaire à l'aide de la sonde NaI ([figure 21](#)).

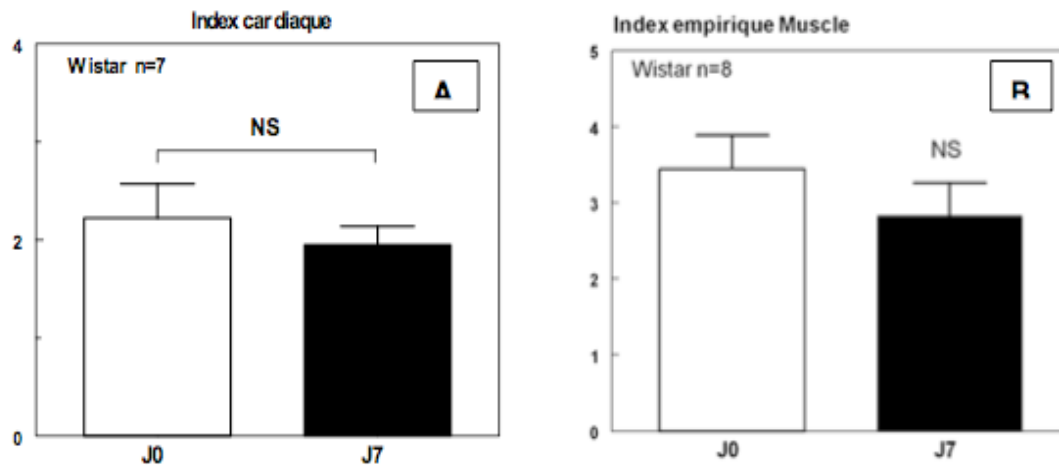


Figure 21 : Reproductibilité de la méthode de mesure des index d'IR cardiaque (A) et musculaire (B).

L'index cardiaque, obtenu par modélisation, chez des rats témoins Wistar est proche de 2 et témoigne de l'insulinosensibilité cardiaque de ces rats (Fig. 21A). Sur ces mêmes rats, l'index d'insulinorésistance musculaire est proche de 3 et témoigne de l'insulinosensibilité musculaire de ces rats (Fig. 21B). De plus, la mesure de chaque index réalisée sur le même animal à 7 jours d'intervalle est reproductible (différence de mesure non significative entre J0 et J7). La cinétique sanguine a été obtenue par prélèvements sanguins et un index cardiaque obtenu par simple méthode graphique a été développé, comme précédemment pour le muscle, à partir des résultats obtenus, il est bien corrélé à l'index cardiaque obtenu par modélisation (coefficient de corrélation $r^2=0,72$; significativité $p<0,0001$). Il devrait donc permettre par la suite de s'affranchir en grande partie des prélèvements sanguins (données non publiées).

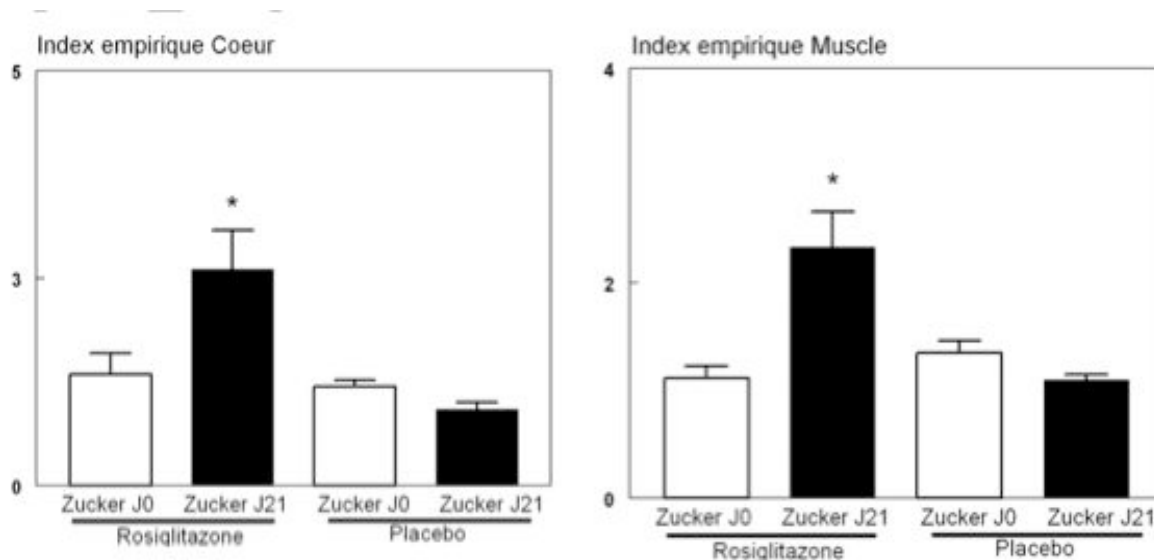


Figure 22 : Sensibilité de la méthode de mesure des index d'IR cardiaque (A) et musculaire (B) (Avant traitement : Jour 0, J0 ; Après traitement : 21 jours, J21).

L'index cardiaque obtenu par méthode graphique chez des rats obèses Zucker est proche de 1,5 et témoigne de l'insulinorésistance cardiaque de ces rats. De plus, la mesure de cet index, réalisée sur le même animal après 3 semaines de traitement avec un insulino-sensibilisateur, la rosiglitazone, montre que cette méthode est sensible. En effet, l'augmentation de l'index cardiaque en fin de traitement indique que les animaux Zucker ont réagi comme attendu au traitement, contrairement au groupe placebo (Fig. 22A). L'index d'insulinorésistance musculaire obtenu par méthode graphique chez ces rats Zucker est proche de 1 et témoigne de l'insulinorésistance musculaire de ces rats. De plus, la mesure de cet index, réalisée sur le même animal après 3 semaines de traitement avec la rosiglitazone montre que cette méthode est sensible (Fig. 22B). En effet, l'augmentation de l'index d'insulinorésistance musculaire en fin de traitement indique que les muscles des animaux Zucker ont été sensibilisés à l'insuline grâce au traitement, contrairement au groupe placebo. Cette dernière expérience valide cette méthode de mesure simultanée de l'insulinorésistance cardiaque et musculaire chez le rat *in vivo* avec le 6-DIG. Elle démontre la reproductibilité et la sensibilité de cette méthode, ainsi

que la pertinence des deux index empiriques obtenus par méthode graphique et ne nécessitant plus de nombreux prélèvements sanguins.

3.2 Pharmacologie secondaire

Aucune donnée animale sur la pharmacodynamie secondaire du 6-DIG n'est disponible. Concernant la composition de la formulation, aucun effet pharmacologique secondaire n'est attendu.

3.3 Pharmacologie d'innocuité

Pour les études relatives au [123I]-6-DIG, un maximum de 190 MBq 6-[123I]-DIG sera utilisé, ce qui correspond à l'activité utilisée en pratique courante dans d'autres indications. Elle sera injectée sous la forme de deux bolus de 2,5 mg de 6-[123I]-DIG chacun, injectés à 20 minutes d'intervalle. La dose totale injectée de 6-[123I]-DIG n'excédera pas 5 mg, et le volume total n'excédera pas 10 ml. L'étude de toxicité en dose unique, après administration d'une dose 1000 fois supérieure à la dose à injecter chez l'homme, n'a montré aucun effet sur le système nerveux central ou cardio-vasculaire. En conséquence, aucun effet secondaire majeur n'est attendu chez les patients devant subir un SPECT scan au 6-[123I]-DIG. Face à une utilisation spécifiquement humaine, et au regard des études non cliniques réalisées et des contrôles analytiques permettant de certifier la pureté chimique de la solution injectable, il n'y a pas de problème de sécurité.

Évaluations de la dosimétrie chez l'homme: La dosimétrie est prévue chez l'homme dans le cadre de la phase 1.

3.4 Interactions pharmacodynamiques

Aucune donnée sur les interactions pharmacodynamiques avec le 6-[123I]-DIG n'est

disponible.

3.5 Discussion et conclusion

En prenant en considération les données non cliniques précédemment rapportées, les résultats ont permis de conclure que le 6-[123I]-DIG :

- 1) Entre rapidement dans les cellules de la même manière que le glucose par l'intermédiaire du transporteur du glucose, mais en revanche, contrairement au glucose il n'est pas un substrat de l'hexokinase et par conséquent il ne reste pas piégé dans les cellules. Sa ressortie des cellules s'effectue également par l'intermédiaire du transporteur du glucose.
- 2) A un comportement semblable à celui du 3-OMG considéré comme traceur de référence du transport de glucose.
- 3) Est un moyen non invasif pour évaluer l'insulinorésistance par imagerie nucléaire et pourrait être un traceur utile pour évaluer la résistance à l'insuline cardiaque et musculaire.

4. PHARMACOCINETIQUE CHEZ L'ANIMAL

4.1 Objectif

L'objectif étant d'utiliser le [123I]-6-DIG comme un traceur du transport du glucose, les études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de démontrer que la molécule entre dans la cellule en utilisant le transporteur du glucose. La biodistribution a été évaluée chez la souris et le rat.

4.2 Absorption

Non appropriée, du fait de l'utilisation par voie intraveineuse.

4.3 Distribution

Les données disponibles ont été présentées dans la partie pharmacologie non clinique.

Le 6-DIG entre en compétition avec le D-glucose pour pénétrer dans les cellules. Il est transporté dans les cellules par l'intermédiaire des transporteurs du glucose. La biodistribution du 6-DIG a notamment été évaluée chez des souris Swiss femelles.

Le 6-DIG a été injecté (100 µL de solution à la concentration de 50 nmol/ml, dans du NaCl à 0.9%) dans la veine latérale de la queue. Afin d'évaluer la distribution dans les principaux organes, les animaux ont été sacrifiés à divers intervalles de temps. Les organes ont été prélevés, pesés et leur radioactivité comptée (tableau 11). Les résultats ont démontré que l'activité du 6-DIG était maximale dans le cœur 2 minutes après l'injection, restait élevée jusqu'à la 15ème minute avant de diminuer jusqu'à la 60ème minute. Dans le cerveau, le 6-DIG s'est accumulé avec le temps jusqu'à atteindre près de 4 % de la dose injectée à la 10ème minute, l'activité à la 60ème minute étant identique à l'activité initiale. Le tissu le plus radioactif au cours de la période de 60 minutes était le sang.

Time (min)	Heart	Liver	Lungs	Kidneys	Brain	Blood
2	7.97 ± 0.18	11.10 ± 0.51	7.80 ± 0.49	8.97 ± 0.68	2.70 ± 0.14	11.90 ± 0.10
5	7.00 ± 0.77*	9.57 ± 0.50*	8.30 ± 0.57	6.97 ± 0.54**	3.53 ± 0.33*	10.20 ± 0.60
10	6.99 ± 0.62*	8.50 ± 0.64*	7.37 ± 0.66	6.90 ± 0.59**	3.97 ± 0.57*	7.53 ± 0.28**
15	6.25 ± 1.14*	6.60 ± 0.22***	6.40 ± 0.14*	6.27 ± 0.41**	3.80 ± 0.25**	7.48 ± 0.53*
60	3.78 ± 1.04***	3.67 ± 0.39***	3.90 ± 0.37***	3.77 ± 0.33***	2.40 ± 0.16	4.90 ± 0.60**

Each value was compared to that obtained 2 minutes p.i.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Mean ± SD ($n = 5$ for the heart and $n = 3$ for the other organs). Results are expressed as % of the injected dose per gram of organ or per millilitre of blood.

Tableau 11: Biodistribution du 6-DIG chez la souris

Le 6-DIG est également rapidement capté par les adipocytes (figure 10) (Henry, 1997). De plus, les études de biodistributions du 6DIG réalisées chez la souris contrôles db/+ et chez le

rat Wistar [Perret, 2003- Perret, 2007) ont montrées que l'activité du traceur augmente dans le muscle squelettique pour atteindre un plateau entre 2 et 5 minutes après l'injection.

4.4 Métabolisme

La transformation biologique du 6-[123I]-DIG a été étudiée dans le cadre de l'étude *in vivo* conduite par Henry *et al.* (Henry, 1997). L'analyse par chromatographie sur couche mince du contenu de plasma a montré que le 6-DIG n'était pas métabolisé *in vivo* et qu'il n'y avait aucune trace détectable d'iode libre radioactif dans le sang.

4.5 Excrétion

Le 6-DIG n'est pas piégé à l'intérieur de la cellule et son élimination est régulée par les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans sa captation (Henry, 1997).

Chez des rats contrôles, lors d'une injection de 6-DIG, la mesure de la radioactivité plasmatique suggère que, après une initiale et rapide (jusqu'à 10 minutes) phase de distribution, la clairance de l'hexose iodé se produit principalement par filtration glomérulaire.

4.6 Interactions de type pharmacocinétique

Données non disponibles chez l'animal.

4.7 Autres études pharmacocinétiques

Données non disponibles chez l'animal.

4.8 Discussion et conclusion

Dans différents modèles biologiques, il a été démontré que le 6-DIG entre dans les cellules par l'intermédiaire des transporteurs de glucose et qu'il parvient à un équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique. L'activité du 6-DIG dans les différents organes étudiés est immédiatement maximale, puis elle décroît, excepté dans le cerveau où elle atteint son maximum 10 minutes après l'injection et le muscle squelettique. L'analyse par

chromatographie sur couche mince du contenu intracellulaire des érythrocytes et des cardiomyocytes isolés, a montré que le 6-DIG n'est pas métabolisé et que son élimination est régulée par les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans son entrée intracellulaire.

5. TOXICITE

Les études de toxicologie générale incluent l'étude en dose unique chez le rat et les analyses de génotoxicité *in vitro*. Les études de toxicologie ont été réalisées chez le rat, conformément aux recommandations de l'ICH. L'administration a été réalisée par voie intraveineuse du fait que c'est la voie d'administration prévue chez l'homme.

Le potentiel génotoxique a été testé *in vitro*, par l'intermédiaire de l'essai de mutation reverse sur bactéries (Ames test), selon les recommandations de l'ICH.

5.1 Toxicité par administration unique

L'étude de toxicité aigue a été réalisée chez le rat par administration de 6-DIG par voie intraveineuse (étude N ° 20080312TRP, Baugy, 26 novembre 2008). L'objectif de l'étude était de caractériser la toxicité du 6-DIG après une administration unique par voie intraveineuse chez le rat Sprague-Dawley et d'établir la dose dépourvue de signe de toxicité. L'étude a eu lieu selon le principe des bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Le rat a été choisi en raison de l'acceptation de son caractère prédictif des effets toxiques des drogues chez l'homme et de sa reconnaissance, par des autorités réglementaires, comme espèce appropriée pour les études de toxicité. Cette étude a impliqué 20 animaux inclus dans 2 groupes de 5 mâles et de 5 femelles chacun (le groupe 1 avec le véhicule et le groupe 2 avec le 6-DIG à la dose de 100 mg/kg). En prenant en considération la dose humaine maximale, la marge de sûreté est de 1000 fois cette dose humaine. L'administration a été réalisée par voie intraveineuse car c'est la voie d'administration prévue chez l'homme. Le 6-DIG a été administré aux animaux par bolus intraveineux de quelques secondes dans la veine caudale.

La mortalité a été enregistrée une fois par jour pendant 14 jours. L'animal a été pesé les jours

suivants: le jour de la randomisation, J1 ou J-1, J7 et J14 et au J15 de l'euthanasie. Les observations cliniques générales ont été effectuées avant la première injection puis à deux reprises le jour de l'injection : 60 minutes ($\pm$ 30 minutes) après la dose et entre 3 et 4 heures après la dose (ou au pic de survenue des signes cliniques si le délai était différent). Elles ont ensuite été réalisées au moins une fois par jour pendant 14 jours. L'état général, le comportement et l'activité ont été observés à J1 (60 minutes $\pm$ 30 minutes après la dose), à J7 (et à J14 si présence de signes à J7). Les animaux ont été observés selon une batterie d'observation standardisée pour les signes cliniques généraux, les signes neurocomportementaux, neurovégétatifs, psychotropiques ou les effets neurotoxiques. La méthode est basée sur le test d'Irwin (1968) modifié en supprimant la graduation de l'intensité des signes cliniques. Les animaux seront observés individuellement dans une cage sans sciure placée dans une salle tranquille. Tous les animaux décédant pendant l'étude ou survivant à la fin du 14ème jour ont été euthanasiés et leurs principaux organes ont été observés macroscopiquement (foie, estomac, intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléum), gros intestin (cæcum, colon, rectum), reins, gonades et organes génitaux, rate, glandes surrénales, poumons, cœur et site d'injection).

Aucun effet indésirable n'a été observé dans les différents groupes testés, y compris lors des examens macroscopiques d'organe.

5.2 Toxicité par administration répétée

Cette étude de toxicité n'est pas nécessaire pour un radiopharmaceutique à visée diagnostique.

5.3 Carcinogénicité

Aucune donnée n'est disponible mais le 6-[123I]-DIG sera employé uniquement pour deux injections successives. Par conséquent, l'exposition de l'homme au 6-[123I]-DIG est brève et il n'est pas attendu d'accumulation de la drogue/des métabolites ou d'exposition prolongée.

5.4 Tolérance locale, telle qu'irritation et sensibilisation

Aucune donnée disponible.

5.5 Toxicité de la reproduction et du développement

La drogue ne sera pas administrée aux femmes enceintes ou aux femmes qui allaitent.

5.6 Génotoxicité in vitro et in vivo

La génotoxicité potentielle de 6-DIG a été examinée *in vitro*, par l'intermédiaire de l'essai de mutation reverse sur bactéries (Ames test - MDS Pharma Services - Etude numéro: AA73451, 10 juin 2008). Cinq souches de *Salmonella typhimurium* dépendantes à l'histidine (TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102) ont été utilisées pour évaluer le potentiel mutagène du 6-DIG, en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique ($\pm$ S9). L'étude a été effectuée en utilisant à la fois la méthode par incorporation directe (méthode par étalement) et la méthode par pré- incubation (37 + 2 °C pendant approximativement 25 minutes sous l'agitation). Le 6-DIG a été testé en solution limpide et incolore, dans de l'eau pour préparation injectable.

Méthode d'incorporation sur plaque:

Sur la base des résultats obtenus dans l'expérimentation préliminaire, cette expérience (Test 1) a été effectuée aux doses de 52, 164, 512, 1600 et 5000 µg/plaque, en présence ou en l'absence d'activation métabolique. Aucun précipité n'a été observé aux doses allant jusqu'à la dose maximale, et ce en présence ou en l'absence d'activation métabolique.

Aucun signe de cytotoxicité en relation avec la dose n'a été observé aux doses allant jusqu'à la dose maximale testée de 5000 µg/plaque, et ce en présence ou en l'absence d'activation métabolique. Aucune augmentation biologiquement ou statistiquement significative dans le nombre de revertants n'a été observée dans les souches, que ce soit en présence ou en

l'absence d'activation métabolique.

Méthode par pré-incubation:

Sur la base des résultats obtenus par la méthode d'incorporation sur plaque, cette expérience (Test 2) a été effectuée aux doses de 492, 878, 1568, 2800 et 5000 µg/plaque, en présence ou en l'absence d'activation métabolique. Aucun précipité n'a été observé aux doses allant jusqu'à la dose maximale de 5000 µg/plaque, et ce en présence ou en l'absence d'activation métabolique.

La drogue ne sera pas administrée aux femmes enceintes ou aux femmes qui allaitent.

Aucun signe de cytotoxicité en relation avec la dose n'a été observé aux doses allant jusqu'à la dose maximale testée de 5000 µg/plaque, et ce en présence ou en l'absence d'activation métabolique. Aucune augmentation biologiquement ou statistiquement significative dans le nombre de revertants n'a été observée dans les souches, que ce soit en présence ou en l'absence d'activation métabolique.

En conclusion, dans les conditions expérimentales et selon les critères du plan d'étude, pour des doses testées allant jusqu'au niveau de dose maximal recommandé de 5000 µg/boîte, et en utilisant à la fois la méthode d'incorporation directe et la méthode de pré-incubation, le 6-DIG n'a pas induit d'augmentation significative du nombre de mutants reverses dans les cinq souches de *Salmonella typhimurium* utilisées (TA98, TA100, TA1535, TA1537 et TA102), que ce soit avec ou sans l'activation métabolique.

Etude clinique Phase 1/2a

1. JUSTIFICATION DE L'ESSAI – PREREQUIS

Notre projet porte sur le transfert à l'homme de la technique de mesure de l'insulino-résistance, parfaitement validée chez l'animal, grâce à l'utilisation du 6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose (6-DIG). C'est pourquoi nous souhaitons mener une étude de phase I /II, afin de vérifier l'innocuité du 6DIG chez l'homme et d'évaluer la faisabilité et la validité de cette mesure en routine clinique. Pour ce faire, nous aurons besoin d'étudier ce nouveau traceur chez des volontaires sains et chez des patients diabétiques volontaires, pour réaliser l'étude de toxicité, l'étude pharmacodynamique et l'étude dosimétrique.

Le radiopharmaceutique, compte-tenu des contraintes liées à sa synthèse et au métabolisme étudié sera injecté par voie IV. L'activité injectée maximale par visite sera de 185 MBq : 92,5 MBq en une injection à J0 et 185 MBq en deux injections à 20 minutes d'intervalle à J7 pour les volontaires sains et 185 MBq à J0 en deux injections à 20 minutes d'intervalle pour les diabétiques, par analogie à ce qui se fait en routine clinique avec d'autres radiopharmaceutiques marqués à l'iode 123 et ce sans prévision d'escalade d'activité injectée. Cette valeur est choisie arbitrairement, en se basant sur notre expérience d'utilisation en routine clinique d'un autre radiopharmaceutique marqué à l'iode 123, le FP-CIT-I123 (DATSCAN, GE Healthcare, médicament autorisé n°562 362.2) utilisé pour l'exploration du système dopaminergique, dont la dose efficace chez un patient de 70 Kg a été calculée à 4,35 mSv pour une activité injectée de 185 MBq (ce qui représente, en ordre de grandeur, moins de deux années d'exposition à la radioactivité naturelle).

Compte-tenu de la nature chimique du produit (glucose), de la faible activité injectée, et des données toxicologiques, les risques à court, moyen et long termes pour les patients inclus dans l'étude sont excessivement faibles.

2. PROTECTION DES PERSONNES

2.1 Justification éthique du protocole

Comme exposé précédemment, il s'agit d'une étude de faisabilité et de tolérance. Les sujets sains et les patients diabétiques se prêtant à la recherche n'en retireront donc aucun bénéfice direct pour leur santé. Leur participation permettra de faire avancer la mise au point d'une méthode rapide et simple pour mesurer l'insulinorésistance.

Compte-tenu de la nature chimique du produit (glucose), de l'élément radioactif injecté (Iode 123 de demi-vie= 13,2 heures qui est un des isotopes les plus utilisés en médecine nucléaire), de la faible activité injectée et des données toxicologiques du produit, les risques à court, moyen et long termes pour les sujets inclus dans l'étude, sont excessivement faibles.

Le seul risque potentiel relève de l'épreuve d'hypoglycémie insulinaire mais du fait de l'existence d'un protocole de surveillance très précis (Protocole standardisé dans le domaine de l'endocrinologie dans le cadre des dosages de sécrétion de l'hormone de croissance) et de sa réalisation en milieu hospitalier avec un encadrement médical spécialisé (présence d'un médecin endocrinologue ayant une solide expérience dans la réalisation de l'épreuve), le risque encouru pour les sujets inclus dans l'étude, est très faible.

2.2 Dispositions éthiques et réglementaires

La recherche est menée dans le respect de la réglementation française en vigueur, notamment des dispositions relatives à la recherche biomédicale du Code de la Santé Publique, article L 1121-1 et suivants, des lois de Bioéthique, de la loi Informatique et Libertés, de la déclaration d'Helsinki, ainsi que des Bonnes Pratiques Cliniques et du présent protocole.

L'investigateur s'engage à mener la recherche conformément à ces dispositions éthiques et réglementaires. Il est conscient que tous les documents ainsi que toutes les données relatives à la recherche pourront faire l'objet d'audits et d'inspections réalisées dans le respect du secret

professionnel et sans que puisse être opposé le secret médical. L'investigateur reconnaît que les résultats de la recherche sont la propriété de l'Inserm, promoteur de la recherche.

2.3 Comité pour la Protection des Personnes (CPP)

Avant la mise en œuvre de la recherche, le promoteur soumettra le projet à l'avis du CPP de lieu et lui fournira pour cela tous les renseignements nécessaires (protocole de recherche, formulaire d'information et de consentement, formulaire de demande d'avis, attestation d'assurance et enregistrement auprès de l'ANSM).

L'essai ne pourra débuter que lorsque l'Inserm aura été informé de l'avis favorable sans réserve délivré par le CPP à propos du protocole soumis. Cet avis comportera le titre et le numéro du protocole attribué par le promoteur, les documents examinés, ainsi que la date de son examen et la liste des membres du CPP y ayant participé.

Le promoteur informera le CPP de tous les amendements ultérieurs et de tous les événements indésirables graves ou inattendus et faits nouveaux apparaissant au cours de la recherche et qui affecteraient vraisemblablement la sécurité des personnes s'y prêtant, conformément à la procédure du promoteur décrite dans le présent protocole.

2.4 Assurance et financement

L'Inserm, en tant que promoteur, a souscrit pour toute la durée de l'essai un contrat d'assurance sous le numéro 010084642009001 (GERLING, 111 rue de Longchamp, 75116 Paris), conformément aux dispositions légales et réglementaires françaises sur les recherches biomédicales.

Le financement de la recherche est assuré par l'ANR (TecSan 2006).

2.5 Modalités de recueil du consentement des personnes

Le consentement éclairé écrit de toutes les personnes qui se prêtent à la recherche doit être

obtenu par l'investigateur, inscrit à l'ordre des médecins, déclaré en tant qu'investigateur auprès du promoteur, avant tout acte pratiqué dans le cadre du protocole de la recherche et ce quel que soit cet acte, conformément à la réglementation.

L'information est donnée oralement et par écrit dans la première partie du formulaire d'information et de consentement. Le formulaire est paraphé en bas de chaque page afin que la personne se prêtant à la recherche atteste qu'elle a bien reçu cette information. L'information est rédigée dans un langage clair, parfaitement compréhensible pour la personne. Elle doit contenir l'ensemble des éléments dont doit être informée la personne, conformément au Code de la Santé Publique, article L 1122-1.

Le consentement de participation de la personne à la recherche est recueilli par écrit sur la seconde partie du formulaire d'information et de consentement. Cette seconde partie doit être rédigée dans un langage clair, parfaitement compréhensible pour la personne qui se prête à la recherche. Elle doit contenir l'ensemble des éléments auxquels la personne consent. Le consentement est donné par apposition de la signature et inscription du prénom, du nom et de la date, de la main de la personne qui se prête à la recherche.

Par ailleurs, l'investigateur qui recueille le consentement date et signe le formulaire à l'emplacement qui lui est réservé et s'assure 1) que le formulaire est conforme et qu'aucune mention ou date n'est manquante, 2) qu'un exemplaire original de ce document est remis au patient. Il conserve un second exemplaire original dans un lieu sécurisé et dont l'accès est contrôlé et 3) place un troisième exemplaire original dans une enveloppe sécurisée à l'attention du promoteur ; ce troisième exemplaire ne doit pas être ouvert par le promoteur, mais conservé avec le dossier permanent de l'étude.

L'investigateur doit s'assurer que la personne qui se prête à la recherche aura eu le temps de prendre sa décision librement et aura pu lire et comprendre le formulaire d'information et de consentement.

Le formulaire d'information et de consentement est un document qui aura été approuvé

préalablement à la mise en œuvre de la recherche par le CPP, à l'occasion de l'examen du protocole.

2.6 Inscription des sujets sur le fichier national des personnes se prêtant à une recherche biomédicale et période d'exclusion

La participation de tous les sujets au présent protocole sera enregistrée sur le fichier national des personnes se prêtant à une recherche biomédicale, géré par le Ministère de la Santé.

La somme annuelle de leurs indemnités sera consignée sur ce fichier.

Les sujets se prêtant à l'étude ne pourront pas participer simultanément à d'autres recherches biomédicales.

A l'issue de leur participation à l'étude, il est prévu une période de 1 mois au cours de laquelle ils ne pourront pas participer à une autre recherche biomédicale.

2.7 Indemnisation des sujets participant à l'étude

Le montant des indemnités perçu par les volontaires sains sera de 600 euros si l'étude est complétée (réalisation de V1, V2, V3 et V4).

Les indemnités seront versées de la façon suivante :

50 euros à la visite V1

250 euros à la visite V2

250 euros si à la visite V3

50 euros à la visite V4

Le montant des indemnités perçu par les diabétiques sera de 350 euros si l'étude est complétée (réalisation de V1, V2 et V3).

Les indemnités seront versées de la façon suivante :

50 euros à la visite V1

250 euros à la visite V2

50 euros à la visite V3

3. OBJECTIFS

3.1 Objectif principal

L'objectif principal de la présente étude est d'évaluer la tolérance de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez des volontaires sains et chez des diabétiques de type 2.

3.2 Objectifs secondaires

Objectif 2 : Evaluer la faisabilité de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez des volontaires sains et des diabétiques de type 2.

Objectif 3 : Evaluer la reproductibilité de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez des volontaires sains.

Objectif 4 : Etudier la pharmacocinétique du 6-DIG chez des volontaires sains et des diabétiques de type 2.

Objectif 5 : Evaluer l'efficacité du 6-DIG pour la mesure de l'insulinorésistance chez des diabétiques de type 2.

4. PLAN EXPERIMENTAL

4.1 Type d'essai

Etude de tolérance et de faisabilité, monocentrique, de phase I/II

4.2 Catégorie de recherche

Investigation à visée diagnostique

4.3 Exposé du plan expérimental

Il s'agit d'une étude monocentrique, non randomisée, non contrôlée, de tolérance chez 12 sujets (6 sujets sains et 6 diabétiques de type 2).

5. CRITERES D'EVALUATION

5.1 Critères de tolérance :

La tolérance est évaluée à partir des critères combinés suivants: recueil des événements indésirables, surveillance de la tension artérielle et de la fréquence cardiaque, électrocardiogrammes, données biologiques sanguines, urinaires, résultats de la scintigraphie.

5.2 Critères de faisabilité :

La faisabilité de la technique est évaluée à partir des données de sécurité, des résultats biologiques et de la scintigraphie.

5.3 Critères de reproductibilité :

La reproductibilité est évaluée chez les volontaires sains, en comparant les résultats obtenus à une semaine d'intervalle.

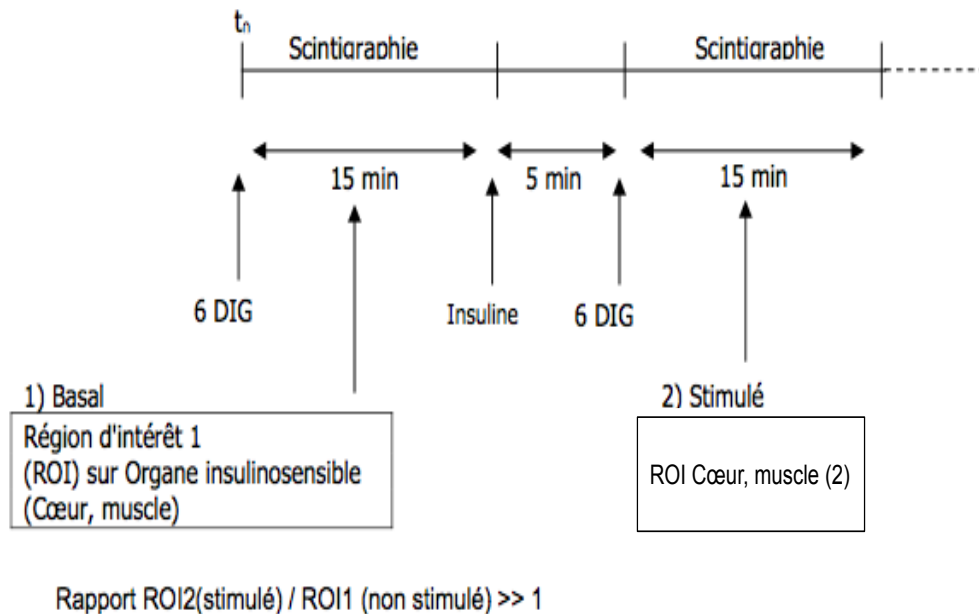
5.4 Critères pharmacocinétiques :

Les critères pharmacocinétiques sont évalués à partir de l'activité radioactive mesurée dans les urines, dans le sang et dans les selles, sur 24h. La dosimétrie des différents organes sera aussi mesurée.

5.5 Critères d'efficacité et technique(s) de mesure

L'efficacité de la technique (qui n'est qu'un critère secondaire de l'étude) est évaluée par scintigraphie. L'efficacité de la méthode pour la mesure de l'insulinorésistance sera évaluée sur les résultats de la scintigraphie en mettant en évidence une augmentation du transport du glucose après stimulation par insuline chez les sujets sains (Rapport ROI 2(stimulé) / ROI 1

(non stimulé) < ROI 2 / ROI 1 (d'un sujet sain)).



5.6 Critères de contrôle de la compliance

Une mesure de l'activité dans la seringue avant et après injection sera réalisée selon la procédure suivante : Immédiatement après l'injection, la seringue sera replacée dans sa valisette et rapportée au laboratoire de radiopharmacie. L'activité radioactive restante sera mesurée à l'aide d'un activimètre MEDI-404.

6. SELECTION DES PERSONNES

6.1 Population étudiée participante

6.1.1 Description des personnes participantes

Les personnes recrutées pour l'étude devront répondre à l'ensemble des critères d'inclusion sans présenter de critères de non-inclusion ou d'exclusion.

6.1.2 Durée de la participation des personnes à la recherche

Les sujets seront inclus dans l'étude pour une durée de 4 semaines pour les volontaires sains et de 3 semaines pour les diabétiques de type 2.

6.1.3 Description du nombre de personnes à inclure et des différents groupes de participants

S'agissant d'une première administration à l'homme, aucune donnée n'est disponible pour calculer le nombre de sujets à inclure. Nous avons choisi d'inclure 6 sujets sains et 6 diabétiques de type 2. Cet effectif permettra, chez les volontaires sains, l'étude de reproductibilité et de faisabilité et chez les diabétiques, une première évaluation de l'efficacité. Nous prévoyons cependant d'avoir à inclure au maximum 8 patients sains et 8 patients diabétiques de type 2 pour anticiper d'éventuelles sorties d'étude prématurées.

Les diabétiques de type 2 seront appariés en âge avec les sujets sains.

6.2 Recrutement et sortie de l'essai

6.2.1 Mode de recrutement

Les volontaires sains seront recrutés parmi les personnes inscrites sur la liste des volontaires pour une recherche clinique du CIC de Grenoble qui répondront aux critères de sélection de l'étude. Une annonce dans la presse écrite locale pourra également être diffusée. Les diabétiques de type 2 seront recrutés par un cardiologue, dans le service de cardiologie du CHU de Grenoble au cours de consultations ou d'hospitalisations s'inscrivant dans le cadre de l'évaluation et la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire.

6.2.2 Description des critères d'inclusion

Volontaires sains

- Age compris entre 35 et 60 ans
- Indice de masse corporelle compris entre 20 et 25
- Tour de taille < 94 cm chez les hommes et < 80 cm chez les femmes
- Glycémie basale normale, comprise entre 3,8 et 5,8 mmol/l
- Insulinémie basale normale, comprise entre 3 et 13 μ UI/ml
- HbA1c < 6%
- Cholestérol total < 2 g/l
- LDL cholestérol < 1,6 g/l
- HDL cholestérol $\geq$ 0,4 g/l chez les hommes et $\geq$ 0,5 g/l chez les femmes
- Triglycérides < 1,5 g/l
- Pour les femmes non ménopausée depuis au moins 1 an ou non stérilisée chirurgicalement : Contraception en cours, hormonale ou physique, à l'exception des méthodes locales (spermicide, diaphragme, cape et préservatif)
- Personne affiliée à la sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime

Diabétiques de type 2

- Age compris entre 35 et 60 ans
- Diabète de type 2 stable : absence de manifestations d'acidocétose dans le mois précédent
- HbA1c dans les trois mois précédant l'inclusion comprise entre 6 et 8% (bornes incluses)
- Traité en monothérapie par metformine ou par régime seul

- Pour les femmes non ménopausées depuis au moins 1 an ou non stérilisée chirurgicalement : Contraception en cours, hormonale ou physique, à l'exception des méthodes locales (spermicide, diaphragme, cape et préservatif)
- Personne affiliée à la sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime

6.2.3 Description des critères de non inclusion ou d'exclusion

Volontaires sains

- Diabète connu
- Autre pathologie évolutive en cours
- Pathologie psychiatrique nécessitant un traitement chronique
- Antécédent d'infarctus du myocarde
- Antécédent de coronaropathie avérée
- Antécédent de troubles du rythme cardiaque
- Hypertension artérielle sévère définie par PAS $\geq$ 180 mmHg et/ou PAD $\geq$ 110 mmHg
- Antécédent d'accident vasculaire cérébral
- Antécédent d'épilepsie
- Antécédent de traumatisme crânien
- Antécédent de chirurgie hypophysaire par voie haute
- Antécédents de pathologie pouvant altérer les capacités d'absorption, de diffusion et d'excrétion du radiopharmaceutique : maladie de Crohn, maladie cœliaque, insuffisance rénale définie par une clairance de la créatinine $<$ 60ml/mn, insuffisance hépatique
- Allergie connue à l'un des constituants du produit à l'étude
- Procédure de médecine nucléaire dans les 30 jours précédents - Traitement en cours pouvant interférer avec le métabolisme du glucose et en particulier : traitement chronique par IMAO, corticoïdes par voie générale et locale, diurétiques thiazidiques, Bêta bloquants,

danazol, chlorpromazine, Bêta2 stimulants par voie générale et locale

- Intoxication volontaire éthylique ou aux stupéfiants
- Régime hypocalorique restrictif, régime végétarien
- Participation à une autre recherche biomédicale dans le même temps ou période d'exclusion en cours d'une autre recherche biomédicale
- Sujet ayant dépassé le seuil d'indemnisation annuelle pour les recherches biomédicale
- Femme enceinte, parturiente, mère qui allaite
- Personne privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, personne faisant l'objet d'une mesure de protection légale
- Conditions de vie laissant présager de l'incapacité à suivre l'ensemble des visites prévues par le protocole

Diabétiques de type 2

- Antécédent d'infarctus du myocarde
- Antécédent de coronaropathie avérée
- Antécédent de troubles du rythme cardiaque
- Hypertension artérielle sévère définie par PAS $\geq$ 180 mmHg et/ou PAD $\geq$ 110 mmHg
- Antécédent d'accident vasculaire cérébral
- Antécédent d'épilepsie
- Antécédent de traumatisme crânien
- Antécédent de chirurgie hypophysaire par voie haute
- Pathologie psychiatrique nécessitant un traitement chronique
- Traitement en cours par insuline
- Traitement en cours autre que la metformine pouvant interférer avec le métabolisme du glucose et en particulier : traitement chronique par IMAO, corticoïdes par voie générale et

locale, diurétiques thiazidiques, Bêta bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, danazol, chlorpromazine, Bêta2 stimulants par voie générale et locale

- Antécédents de pathologie pouvant altérer les capacités d'absorption, de diffusion et d'excrétion du radiopharmaceutique: maladie de Crohn, maladie coéliquae, insuffisance rénale définie par une clairance de la créatinine < 60ml/mn, insuffisance hépatique
- Allergie connue à l'un des constituants du produit
- Procédure de médecine nucléaire dans les 30 jours précédents
- Intoxication volontaire éthylique ou aux stupéfiants
- Régime hypocalorique restrictif, végétarien
- Participation à une autre recherche biomédicale dans le même temps ou période d'exclusion en cours d'une autre recherche biomédicale
- Femme enceinte, parturiente, mère qui allaite
- Personne privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, personne faisant l'objet d'une mesure de protection légale
- Conditions de vie laissant présager de l'incapacité à suivre l'ensemble des visites prévues par le protocole

6.2.4 Conditions de sortie d'essai

Les sujets peuvent interrompre leur participation à tout moment sans n'encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice de ce fait. En cas d'événements indésirables graves ou si le comité de surveillance de la sécurité le demande, un arrêt d'étude peut être envisagé.

Pour les sujets pour lequel les données ne sont pas complètes, leur remplacement par un autre sujet répondant aux critères de sélection de l'étude, sera discuté par le comité de surveillance de la sécurité de l'étude.

6.2.5 Modalités à mettre en place en fin de participation à l'essai

A l'issue de la recherche, une visite de fin d'étude est prévue. A l'issue de cette visite, les patients diabétiques de type 2 poursuivront le suivi habituel de leur pathologie. Concernant les volontaires sains, aucun suivi particulier n'est nécessaire.

6.2.6 Modalités à mettre en place en cas de sortie de l'essai

En cas d'arrêt prématuré de l'étude pour un sujet, la cause de cet arrêt devra être recueillie.

Une visite de sortie prématurée de l'étude sera proposée.

Aucune alternative thérapeutique ou prise en charge médicale spécifique n'est adaptée et proposée dans le cadre de cette étude.

6.2.7 Modalités à mettre en place en cas de découverte de résultats significatifs concernant la santé de la personne

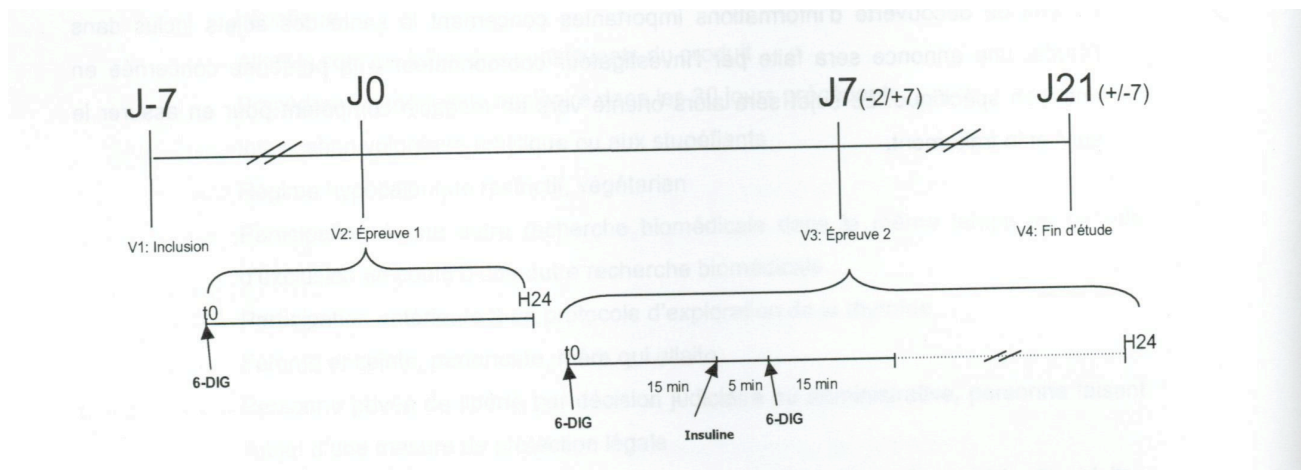
En cas de découverte d'informations importantes concernant la santé des sujets inclus dans l'étude, une annonce sera faite par l'investigateur coordonnateur à la personne concernée en entretien spécifique. Le sujet sera alors orienté vers un médecin compétent pour en assurer le suivi et le traitement.

7. REALISATION PRATIQUE DU PROTOCOLE

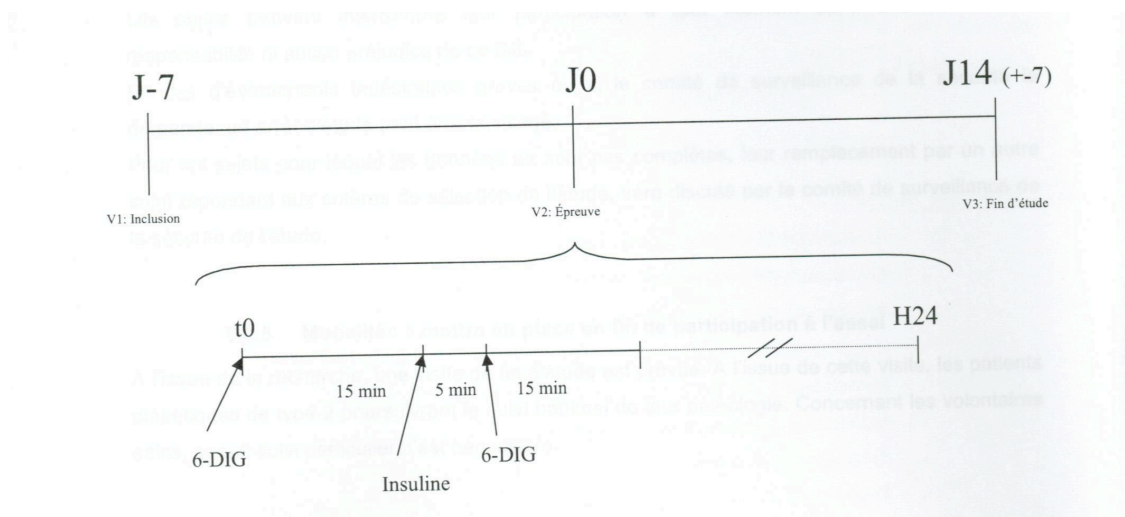
7.1 Description détaillée des actes pratiqués sur les personnes

7.1.1 Schéma expérimental :

Etude chez les volontaires sains



Etude chez les diabétiques de type 2



7.1.2 Déroulement pratique de l'étude:

Schéma général de progression de l'étude - Intervention du Comité de Surveillance de la Sécurité de l'Etude - Intervention du Comité de Pilotage de l'Etude

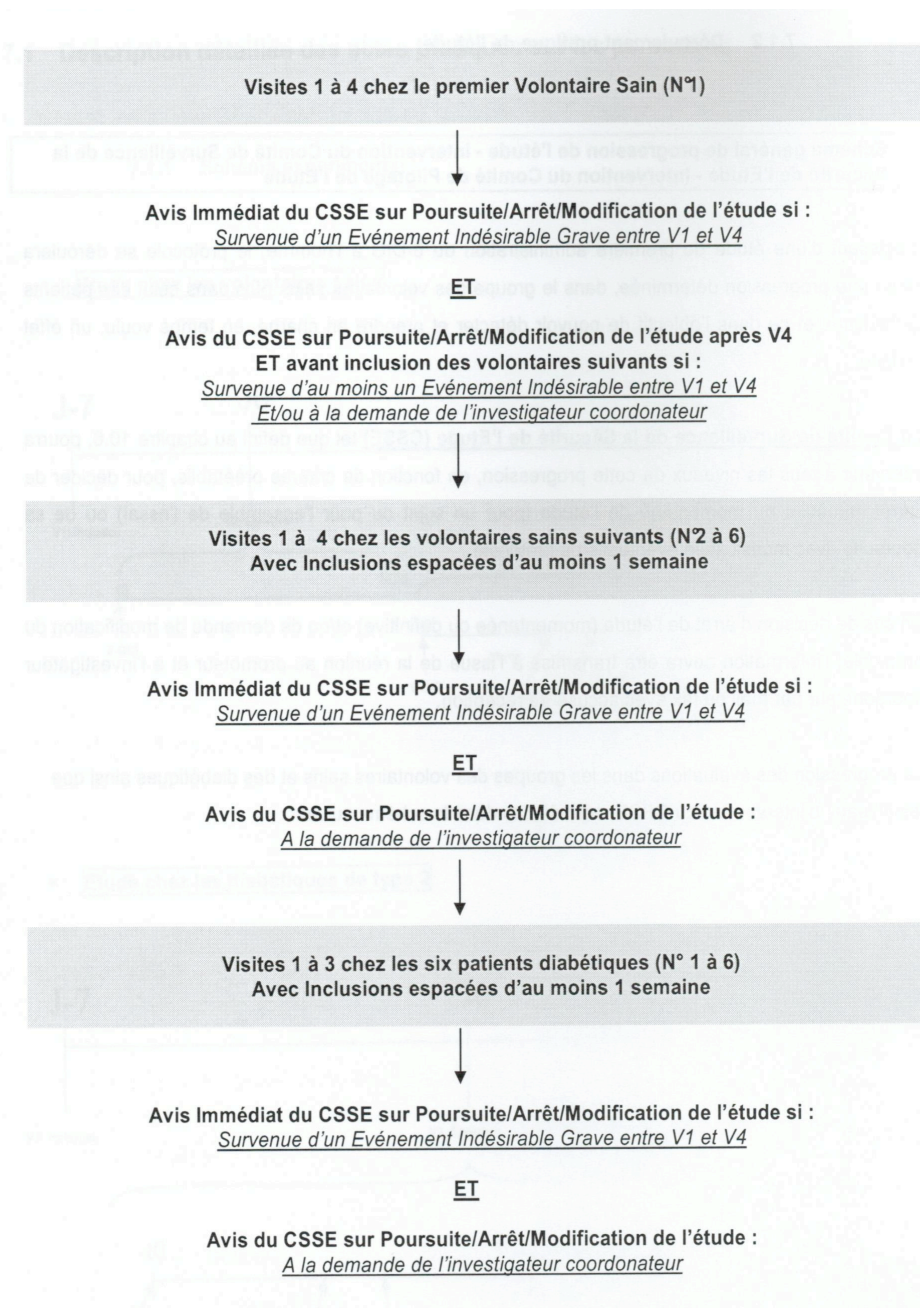
S'agissant d'une étude de première administration du 6-DIG à l'homme, le protocole se déroulera selon une progression déterminée, dans le groupe des volontaires sains puis dans celui des patients diabétiques et ce dans l'objectif de pouvoir détecter et prendre en charge, en

temps voulu, un effet toxique.

Le Comité de Surveillance de la Sécurité de l'Etude (CSSE) tel que défini au chapitre 10.6, pourra intervenir à tous les niveaux de cette progression, en fonction de critères préétablis, pour décider de l'arrêt immédiat ou momentané de l'étude (pour un sujet ou pour l'ensemble de l'essai) ou de sa poursuite avec modification éventuelle du protocole.

En cas de décision d'arrêt de l'étude (momentanée ou définitive) et/ou de demande de modification du protocole, l'information devra être transmise à l'issue de la réunion au promoteur et à l'investigateur coordonnateur par mail ou fax avec accusé de réception.

La progression des évaluations dans les groupes des volontaires sains et des diabétiques ainsi que les niveaux d'intervention du CSSE, sont décrits dans le schéma suivant :



Le Comité de Pilotage de l'Etude (CPE) tel que défini au chapitre 17.4, se réunira :

- Au terme de la dernière visite du dernier volontaire sain et avant l'inclusion du premier patient diabétique. Il aura pour mission de vérifier que l'étude chez les volontaires sains s'est déroulée conformément au protocole. Il prendra connaissance des données de tolérance recueillies pour chacun des volontaires, des rapports du Comité de Surveillance de l'Etude si ce dernier s'est réuni et il statuera sur les éventuelles modifications à apporter au protocole

avant l'inclusion du premier patient diabétique.

- Au terme de la dernière visite du dernier patient diabétique. Il aura pour mission de vérifier que l'étude chez les diabétiques s'est déroulée conformément au protocole. Il prendra connaissance des données de tolérance recueillies pour chacun des patients et des rapports du Comité de Surveillance de l'Etude si ce dernier s'est réuni.
- A la demande de l'investigateur coordonnateur, à tout moment de l'étude.

Déroulement de l'étude chez les volontaires sains

Visite V1 (J-7 à J-1) :

Elle sera réalisée au CIC du CHU de Grenoble. Les volontaires auront une visite médicale préalablement à l'inclusion, conformément à la législation en cours. Les volontaires recevront de la part de l'investigateur, une information orale complète sur l'étude. Il leur sera remis la note d'information écrite. L'investigateur vérifiera si les volontaires répondent à l'ensemble des critères d'inclusion de l'étude. Un temps de réflexion sera proposé aux volontaires à l'issue duquel l'investigateur recueillera leur consentement écrit.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Prélèvement urinaire : analyse par bandelette
- Test de grossesse urinaire pour les femmes
- Prélèvement sanguin : NFS plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA,

HbA1c, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, glycémie, insulínémie.

La liste des traitements pris au cours du mois précédent sera établie.

Les comprimés d'Iodure de potassium seront dispensés au volontaire. Ils permettront un blocage préventif de la thyroïde afin de diminuer l'irradiation de la personne. Il lui sera demandé de prendre :

- un comprimé de 130 mg le soir la veille de la visite 2 et un comprimé de 130 mg 12 à 24 heures après l'injection de 6-DIG de la visite V2.
- un comprimé de 130 mg le soir la veille de la visite 3 et un comprimé de 130 mg 12 à 24 heures après l'injection de 6-DIG de la visite V3.

Visite V2 (J0) :

Les volontaires sains seront admis en début de matinée, un lundi, mardi, mercredi ou jeudi, dans le service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble pour une hospitalisation de 24 heures.

Ils devront être à jeun depuis une durée d'au moins 8 heures. Dans le cas contraire, la visite sera reportée. L'investigateur vérifiera que le comprimé d'Iodure de potassium a bien été pris la veille au soir. Si ce n'est pas le cas, il sera pris dès l'arrivée en médecine nucléaire.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Prélèvement sanguin : NFS, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine

- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes

Les critères d'inclusion et d'exclusion seront vérifiés.

Ils recevront au temps t0 une injection unique de 6-DIG par voie intraveineuse à la dose de 92,5MBq selon le mode d'administration décrit au chapitre 8.

Les paramètres mesurés lors de cette épreuve seront les suivants :

Données de sûreté :

- Fréquence cardiaque, tension artérielle: Au moment de l'injection de 6-DIG (t0) puis : 25 minutes (t25), 1 heure (H1), 8 heures (H8) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Electrocardiogramme : A t0, H1 et H24.
- Numération Formule Sanguine, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine : H24.
- Insulinémie et glycémie : A t0, 30 secondes (30s) après l'injection de 6-DIG, puis 1 minute (t1), 2 minutes (t2), 5 minutes (t5), 10 minutes (t10), 15 minutes (t15), 25 minutes (t25), 1 heure (H1) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette) : H24
- Les échantillons de sang, urine et selles, seront recueillis à H1, H4, H8 et H24 pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.
- Des mesures scintigraphiques seront réalisées à t0 (balayage corps entier et acquisition dynamique) puis à H1, H2, H4, H8 et H24 (par balayage du corps entier). A partir des images scintigraphiques corps entier, les régions d'intérêt seront réalisées pour identifier les différents organes et obtenir une évolution temporelle de l'activité dans chacun de

ceux-ci. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123.

La dosimétrie des différents organes sera calculée à partir du logiciel OLINDA/EXM (Organ Level INternal Dose Assessment/ EXponential Modeling).

L'injection du 6-DIG sera réalisée par le manipulateur de radiologie du service de médecine nucléaire en présence du médecin de médecine nucléaire. La seringue ayant servi à l'injection sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

L'infirmière du CIC procédera au recueil des paramètres de sûreté et au recueil des échantillons de sang, urine et selles pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.

Le patient bénéficiera tout au long des 24 heures de son hospitalisation, d'une surveillance médicale étroite, organisée autour de l'équipe suivante :

- Infirmières du service de médecine nucléaire (présentes 24 heures sur 24 dans le service)
- Infirmière du CIC présente aux temps de recueil des données
- Médecin de médecine nucléaire présent de 8H00 à 18H00 dans le service
- Médecin de garde joignable le soir à partir de 18 heures

En cas de survenue, au cours des 24 heures d'hospitalisation, d'une urgence vitale inopinée, la procédure SIERRA du CHU de Grenoble sera activée par le personnel médical ou paramédical présent auprès du sujet. Elle déclenchera la mobilisation d'un réanimateur du CHU ou en cas d'empêchement de ce dernier, l'intervention du SMUR.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis et notifiés dans le cahier de recueil de données par le médecin de médecine nucléaire.

Visite V3 (J7) :

Une semaine $\pm$ 1 jour après la visite J0, les volontaires reviendront, un lundi, mardi, mercredi ou jeudi, dans le service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble, pour une nouvelle hospitalisation de 24 heures.

Ils devront être à jeun depuis une durée d'au moins 8 heures. Sinon la visite sera reportée.

Les critères d'exclusion imposés par la réalisation du test hypoglycémique seront vérifiés.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Prélèvement sanguin : NFS, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes

Ils recevront au temps t0, une première injection de 6-DIG à la dose de 92,5 MBq (selon le mode d'administration décrit au chapitre 8) puis une injection d'insuline, 15 minutes plus tard soit à t15 et enfin une seconde injection de 6-DIG (92,5 MBq), 5 minutes après l'injection d'insuline soit à t20.

L'insuline sera injectée par voie intraveineuse, en 30 secondes, à la dose de 0,10 U/kg si IMC < 25 kg/m² et 0,15 U/kg si IMC $\geq$ 25 kg/m².

Les paramètres mesurés lors de ces épreuves seront les suivants :

Données de sûreté :

- Fréquence cardiaque, tension artérielle: Au moment de l'injection de 6-DIG (t0) puis : 25 minutes (t25), 1 heure (H1), 8 heures (H8) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Electrocardiogramme : A t0, H1 et H24.
- Numération : NFS, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine : H24.
- Insulinémie: A t0, 30 secondes (30s) après l'injection de 6-DIG, puis 1 minute (t1), 2 minutes (t2), 5 minutes (t5), 10 minutes (t10), 15 minutes (t15), 25 minutes (t25), 1 heure (H1) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Glycémie: A t0, 30 secondes (30s) après l'injection de 6-DIG, puis 1 minute (t1), 2 minutes (t2), 5 minutes (t5), 10 minutes (t10), 15 minutes (t15), 25 minutes (t25), 30 minutes (t30), 45 minutes (t45), 60 minutes (t60), 75 minutes (t75) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette) : H24

A t15, t30, t45, t60 et t75, la glycémie sera analysée conjointement au laboratoire et par un lecteur de glycémie (glycémie capillaire, Accu-Chek Sensor®, Roche).

Conformément à la procédure du test d'hypoglycémie insulinique, des dosages de glycémie supplémentaires seront effectués au lecteur de glycémie en cas d'apparition de symptômes cliniques en rapport avec l'hypoglycémie induite.

- Les échantillons de sang, urine et selles, seront recueillis à H1, H4, H8 et H24 pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.
- Des mesures scintigraphiques seront réalisées à t0 (balayage corps entier et acquisition dynamique) puis à H1, H2, H4, H8 et H24 (par balayage du corps entier). A partir des images scintigraphiques corps entier, les régions d'intérêt seront réalisées pour identifier les différents organes et obtenir une évolution temporelle de l'activité dans chacun de ceux-ci. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123.

La dosimétrie des différents organes sera calculée à partir du logiciel OLINDA | EXM® (Organ Level Internal Dose Assessment | EXponential Modeling)

Un petit déjeuner sera remis au sujet après la fin du test (t60 minutes), une fois l'examen scintigraphique de H1 finalisé.

L'injection du 6-DIG sera réalisée par le manipulateur de radiologie du service de médecine nucléaire en présence du médecin de médecine nucléaire. La seringue ayant servi à l'injection sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

L'injection d'insuline sera réalisée par une infirmière du CIC en présence du médecin diabétologue de l'étude et du médecin de médecine nucléaire selon la procédure prédéterminée.

La surveillance clinique des sujets, pendant la phase d'hypoglycémie, s'effectuera sous la responsabilité du médecin diabétologue assistée par une infirmière du service de médecine nucléaire qui sera présente en permanence au lit du sujet. Les symptômes cliniques de l'hypoglycémie seront pris en charge avec resucrage per-os ou si besoin par l'injection d'une ampoule de G30%.

L'infirmière du CIC procédera au recueil des paramètres de sûreté et au recueil des échantillons de sang, urine et selles pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.

Le patient bénéficiera tout au long des 24 heures de son hospitalisation, d'une surveillance médicale étroite, organisée autour de l'équipe suivante :

- Infirmières du service de médecine nucléaire (présentes 24 heures sur 24 dans le service)
- Infirmière du CIC présente aux temps de recueil des données
- Médecin de médecine nucléaire présent de 8H00 à 18H00 dans le service
- Médecin de garde joignable le soir à partir de 18 heures

En cas de survenue, au cours des 24 heures d'hospitalisation, d'une urgence vitale inopinée, la procédure SIERRA du CHU de Grenoble sera activée par le personnel médical ou paramédical présent auprès du sujet. Elle déclenchera la mobilisation d'un réanimateur du CHU ou en cas d'empêchement de ce dernier, l'intervention du SMUR.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis et notifiés dans le cahier de recueil de données par le médecin de médecine nucléaire.

Visite V4 (J21)

En fin d'étude, 2 semaines ($\pm$ 7 jours) après la dernière période d'hospitalisation de 24 heures, une visite de fin d'étude aura lieu au CIC du CHU de Grenoble.

Les examens suivants seront pratiqués :

- Examen clinique
- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos

- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes
- Prélèvement sanguin : NFS plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, glycémie.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis.

Déroulement de l'étude chez les diabétiques

Visite V1 (J-7 à J-1) :

Elle sera réalisée au CIC du CHU de Grenoble. Les patients auront eu une visite médicale, préalablement à l'inclusion, réalisée par l'investigateur cardiologue qui aura sélectionné le patient. Les patients auront reçu de la part de l'investigateur cardiologue, une information orale complète sur l'étude. Ce dernier leur aura remis la note d'information écrite.

A la visite d'inclusion (V1), l'investigateur du CIC vérifiera si les patients répondent à l'ensemble des critères d'inclusion de l'étude. Il répondra aux éventuelles questions des patients sur l'étude et recueillera leur consentement écrit, à l'issue d'un temps de réflexion.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Examen clinique
- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette) et dosage de la microalbuminurie sur

échantillon

- Test de grossesse urinaire pour les femmes
- Prélèvement sanguin : NFS plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, HbA1c, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, glycémie, insulínémie.

La liste des traitements pris au cours du mois précédent sera établie.

Si le patient est traité par metformine, il lui sera demandé de stopper son traitement 48 heures avant la date prévue de la visite V2 et ce dans l'objectif d'éliminer toute interaction du traitement antidiabétique avec les épreuves prévues à V2. Cet arrêt temporaire du traitement du diabète, ne présente pas de risque pour la santé du patient car les patients inclus dans l'étude sont des diabétiques dont la pathologie est stable et bien équilibrée.

Si le patient est traité par inhibiteur de l'enzyme de conversion, il lui sera demandé de stopper son traitement 48 heures avant la date prévue de la visite V2 et ce dans l'objectif d'éliminer toute interaction du traitement avec les épreuves prévues à V2. Cet arrêt temporaire du traitement ne présente pas de risque pour la santé du patient car les patients inclus dans l'étude sont des sujets ne présentant pas d'hypertension artérielle sévère.

Les comprimés d'Iodure de potassium seront dispensés au volontaire. Ils permettront un blocage préventif de la thyroïde afin d'éviter une irradiation excessive.. Il lui sera demandé de prendre :

- un comprimé de 130 mg le soir la veille de la visite 2 et un comprimé de 130 mg 12 à 24 heures après l'injection de 6-DIG de la visite V2.
- un comprimé de 130 mg le soir la veille de la visite 3 et un comprimé de 130 mg 12 à 24

heures après l'injection de 6-DIG de la visite V3.

Visite V2 (J0) :

Les patients seront admis en début de matinée, un lundi, mardi, mercredi ou jeudi, dans le service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble pour une hospitalisation de 24 heures.

Ils devront être à jeun depuis au moins 8 heures. Sinon, la visite sera reportée. L'investigateur vérifiera que le comprimé d'Iodure de potassium a bien été pris la veille au soir. Si ce n'est pas le cas, il sera pris dès l'arrivée en médecine nucléaire.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Prélèvement sanguin : NFS, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes

Les critères d'exclusion imposés par la réalisation du test hypoglycémique seront vérifiés.

Ils recevront au temps t0, une première injection de 6-DIG à la dose de 92,5 MBq (selon le mode d'administration décrit au chapitre 8) puis une injection d'insuline, 15 minutes plus tard soit à t15 et enfin une seconde injection de 6-DIG (92,5 MBq), 5 minutes après l'injection d'insuline soit à t20.

L'insuline sera injectée par voie intraveineuse, en 30 secondes, à la dose de 0,15 U/kg si IMC < 25 kg/m² et 0,20 U/kg si IMC ≥ 25 kg/m² selon le protocole.

La seringue ayant servi à l'injection du 6-DIG, sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

Les paramètres mesurés lors de ces épreuves seront les suivants :

Données de sûreté :

- Fréquence cardiaque, tension artérielle: Au moment de l'injection de 6-DIG (t0) puis : 25 minutes (t25), 1 heure (H1), 8 heures (H8) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Electrocardiogramme : A t0, H1 et H24. NFS, plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, bilirubine, ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γGT, TP, TCA, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, triglycérides, adiponectine : H24.
- Insulinémie: A t0, 30 secondes (30s) après l'injection de 6-DIG, puis 1 minute (t1), 2 minutes (t2), 5 minutes (t5), 10 minutes (t10), 15 minutes (t15), 25 minutes (t25), 1 heure (H1) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG.
- Glycémie: A t0, 30 secondes (30s) après l'injection de 6-DIG, puis 1 minute (t1), 2 minutes (t2), 5 minutes (t5), 10 minutes (t10), 15 minutes (t15), 25 minutes (t25), 30 minutes (t30), 45 minutes (t45), 60 minutes (t60), 75 minutes (t75) et 24 heures (H24) après l'injection de 6-DIG
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette) : H24 A t15, t30, t45, t60 et t75,
- La glycémie sera analysée conjointement au laboratoire et par un lecteur de glycémie (glycémie capillaire, Accu-Chek Sensor®, Roche).

Conformément à la procédure du test d'hypoglycémie insulinique, des dosages de glycémie supplémentaires seront effectués au lecteur de glycémie en cas d'apparition de symptômes cliniques en rapport avec l'hypoglycémie induite.

- Les échantillons de sang, urine et selles, seront recueillis à H1, H4, H8 et H24 pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.
- Des mesures scintigraphiques seront réalisées à t0 (balayage corps entier et acquisition dynamique) puis à H1, H2, H4, H8 et H24 (par balayage du corps entier). A partir des images scintigraphiques corps entier, les régions d'intérêt seront réalisées pour identifier les différents organes et obtenir une évolution temporelle de l'activité dans chacun de ceux-ci. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123.

La dosimétrie des différents organes sera calculée à partir du logiciel OLINDA/EXM (Organ Level Internal Dose Assessment/ EXponential Modeling).

Un petit déjeuner sera remis au sujet après la fin du test (t60 minutes), une fois l'examen scintigraphique de H1 finalisé.

L'injection du 6-DIG sera réalisée par le manipulateur de radiologie du service de médecine nucléaire en présence du médecin de médecine nucléaire. La seringue ayant servi à l'injection sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

L'injection d'insuline sera réalisée par une infirmière du CIC en présence du médecin diabétologue de l'étude et du médecin de médecine nucléaire. La surveillance clinique des

sujets, pendant la phase d'hypoglycémie, s'effectuera sous la responsabilité du médecin diabétologue assistée par une infirmière du service de médecine nucléaire qui sera présente en permanence au lit du sujet. Les symptômes cliniques de l'hypoglycémie seront pris en charge avec resucrage per-os ou injection d'une ampoule de G30%.

L'infirmière du CIC procédera au recueil des paramètres de sûreté et au recueil des échantillons de sang, urine et selles pour comptage dosimétrique et étude pharmacocinétique.

Le patient bénéficiera tout au long des 24 heures de son hospitalisation, d'une surveillance médicale étroite, organisée autour de l'équipe suivante :

- Infirmières du service de médecine nucléaire (présentes 24 heures sur 24 dans le service)
- Infirmière du CIC présente aux temps de recueil des données
- Médecin de médecine nucléaire présent de 8H00 à 18H00 dans le service
- Médecin de garde joignable le soir à partir de 18 heures

En cas de survenue, au cours des 24 heures d'hospitalisation, d'une urgence vitale inopinée, la procédure SIERRA du CHU de Grenoble sera activée par le personnel médical ou paramédical présent auprès du sujet. Elle déclenchera la mobilisation d'un réanimateur du CHU ou en cas d'empêchement de ce dernier, l'intervention du SMUR.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis et notifiés dans le cahier de recueil de données par le médecin de médecine nucléaire.

Si le traitement par metformine et/ou par inhibiteur de l'enzyme de conversion a été stoppé dans le cadre du protocole, le médecin de médecine nucléaire se chargera, au terme de l'hospitalisation et après avoir pris connaissance des résultats du bilan biologique du patient,

de prescrire à nouveau les traitements interrompus.

Visite V3 (J14)

En fin d'étude, 2 semaines ($\pm$ 7 jours) après la dernière période d'hospitalisation de 24 heures, une visite de fin d'étude aura lieu au CIC du CHU de Grenoble.

Les examens suivants seront pratiqués :

- Examen clinique
- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Prélèvement urinaire (analyse par bandelette)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes
- Prélèvement sanguin : NFS plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP, TCA, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, glycémie.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis.

8 ADMINISTRATION DE PRODUITS

8.1 6-DIG

8.1.1 Posologie et conditions d'administration

Le 6-DIG sera injecté à la dose de 92,5 MBq. Cette dose correspond à la pratique courante, pour obtenir une image d'une qualité acceptable. S'agissant d'une première administration chez l'homme, un premier volontaire recevra le produit et accomplira toutes les visites de l'étude avant que les autres ne soient inclus.

Les volontaires sains recevront deux séquences d'injections du produit (une injection pour la

première séquence, 2 injections pour la seconde séquence) à une semaine d'intervalle, les sujets diabétiques une seule séquence comportant 2 injections. La demi-vie du produit est de 13,2 heures.

8.1.2 Mode d'administration

Le 6-DIG sera administré par voie Intraveineuse (IV).

8.1.3 Présentation des produits

Le 6-DIG-I123 sera conditionné en seringue pour injection IV. Le volume à injecter dépendra de l'activité radioactive de la solution préparée. Ce volume n'excèdera pas 10 ml. L'étiquetage de la seringue comportera les informations habituellement indiquées par la radiopharmacie ainsi que les informations réglementaires, à savoir :

- Identité du promoteur et nom, adresse et numéro de téléphone de l'investigateur coordonnateur
- Nom du produit, forme pharmaceutique, voie d'administration, volume
- Activité
- Date et heure de dispensation
- N° d'ordonnancier de la radiopharmacie
- Acronyme du nom de la recherche
- Identifiant du sujet auquel est destiné le produit
- Mention « Pour recherche biomédicale uniquement »
- Conditions de stockage
- Date de péremption
- Pictogramme du « Trèfle radioactif »

L'étiquette sera éditée en trois exemplaires : l'un pour la seringue, le second pour la fiche

d'injection et le troisième sera à coller dans le cahier d'observation.

8.1.4 Circuit pharmaceutique

Approvisionnement et stockage : les flacons de 6-DIG seront livrés au secteur Essais Cliniques de la PUI du CHU de Grenoble et y seront stockés jusqu'à utilisation : pour chaque préparation une ordonnance sera rédigée par un médecin de l'étude afin que la radiopharmacie puisse récupérer le flacon nécessaire. Cette dispensation sera tracée sur l'ordonnancier des essais cliniques de la PUI du CHU de Grenoble. L'Iode 123 arrivera directement dans le service de médecine nucléaire et y restera stocké.

Préparation, dispensation : le marquage à l'iode 123 du 6-DIG sera fait extemporanément pour chaque sujet inclus le jour de l'injection après prescription médicale. Cette préparation sera tracée sur l'ordonnancier de la radiopharmacie du CHU de Grenoble. La seringue ainsi préparée sera mise dans un protège-seringue puis placée dans une valisette de transport plombée et amenée ainsi dans la salle où sera réalisée l'injection.

Retour des unités de produit expérimental et conservation : une fois l'injection réalisée, la seringue fera l'objet d'une mesure de l'activité restante avant d'être éliminée par la voie classique des déchets radioactifs du service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble. Le flacon sera quand à lui conservé en décroissance dans sa protection plombée jusqu'à la fin de l'étude.

8.1.5 Méthode de contrôle de la compliance

Les injections seront réalisées au cours d'une hospitalisation, ce qui permet de contrôler la compliance. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu d'anomalie lors de l'injection, l'activité restante dans la seringue sera mesurée immédiatement après emploi.

8.1.6 Modalités de modification du schéma thérapeutique

Toute modification nécessitera l'avis du Comité de Pilotage de l'étude et du CPP.

8.2 Insuline

L'insuline (Actrapid® ou Umuline Rapide®) n'est pas un médicament expérimental dans cette étude, mais un médicament réactif. Il n'est donc pas nécessaire de lui appliquer un étiquetage spécifique. Un lot de seringues d'insuline sera stocké au niveau de la radiopharmacie. L'injection sera tracée dans le dossier informatique du sujet, avec indication de la dose injectée, de l'heure d'injection, n° de lot et de la date de péremption.

L'injection d'insuline sera réalisée par une infirmière en présence du médecin diabétologue de l'étude et du médecin de médecine nucléaire.

Le protocole d'hypoglycémie insulinique est présenté en annexe 17.5 du présent document.

Pour mémoire, la dose sera de 0,10 à 0,15 U/kg de poids pour les volontaires sains (0,10 U/kg si $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ - 0,15 U/kg si $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) et de 0,15 à 0,20 U/kg de poids pour les sujets diabétiques (0,15 U/kg si $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ - 0,20 U/kg si $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$).

8.3 Traitements autorisés pendant l'essai

Tous les traitements sont autorisés hormis ceux ayant un effet sur le métabolisme glucidique.

8.4 Traitements non autorisés pendant l'essai

- IMAO
- Corticoïdes par voie générale et locale
- Diurétiques thiazidiques
- Bêta bloquants
- Danazol

- Chlorpromazine
- Bêta2 stimulants par voie générale et locale
- IEC (arrêt 48h avant la visite V2 pour les diabétiques)
- Metformine (arrêt 48 heures avant la visite V2 pour les diabétiques)
- Autre antidiabétique oral
- Insuline

NB : Toute procédure de médecine nucléaire autre que celle réalisée dans le cadre du protocole, est non autorisée pendant l'étude.

9. COLLECTION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES D'ORIGINE HUMAINE

Aucune collection d'échantillons biologiques ne sera réalisée au cours de l'étude. Les échantillons biologiques recueillis au cours de l'étude seront détruits immédiatement après la réalisation des dosages prévus dans le cadre de ce protocole.

10. VIGILANCE DE L'ESSAI

10.1 Définition des événements indésirables (dont aspects spécifiques à l'étude)

Événement indésirable : toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au(x) médicament(s) expérimenté(s) sur lesquels porte(nt) cette recherche.

Effet indésirable d'un médicament expérimental (EI) : toute réaction nocive et non désirée à un médicament expérimental quelle que soit la dose administrée.

Effet indésirable inattendu désigne tout effet indésirable du produit dont la nature, la sévérité ou l'évolution ne concorde pas avec le Résumé des Caractéristiques du Produit (R.C.P.) pour les médicaments autorisés ou la Brochure pour l'Investigateur pour les médicaments non autorisés.

Fait Nouveau : données de sécurité qui pourrait modifier significativement l'évaluation du rapport des bénéfices et des risques du médicament expérimental ou de l'essai.

Evénement indésirable grave ou effet indésirable grave (EIG): tout événement indésirable ou effet indésirable qui :

- entraîne la mort,
- met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche,
- nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation,
- provoque une incapacité ou un handicap important ou durable,
- se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale, et s'agissant du médicament, quelle que soit la dose administrée.

D'autres cas d'événements indésirables ne répondant pas à la définition de gravité ci-dessus doivent également faire l'objet d'une **déclaration immédiate** :

- événements nécessitant une intervention médicale pour prévenir l'évolution vers un des états précités
- événements potentiellement graves selon le jugement de l'investigateur.

Identification du document de référence utilisé pour définir le caractère inattendu d'un EIG : -
Brochure de l'investigateur (version, date)

10.2 Responsabilités de l'investigateur

L'investigateur doit notifier au promoteur, sans délai, à compter du jour où il en a connaissance, tous les événements indésirables graves survenus dans l'essai. Cette notification initiale fait l'objet d'un rapport écrit et doit être suivie rapidement par un ou des rapport(s) complémentaire(s) écrit(s) détaillé(s).

Chaque événement indésirable doit être évalué par l'investigateur ce qui inclut l'évaluation de la gravité et du lien de causalité entre l'événement indésirable et le(s) médicament(s) expérimental (aux) ou le(s) traitement(s) associé(s) et ou avec les procédures de la recherche.

En cas d'événement entraînant le décès ou une menace vitale immédiate, un rapport de suivi doit être envoyé dans les 8 jours suivant la notification initiale.

10.3 Responsabilités du promoteur :

Conjointement à l'investigateur le promoteur évalue le lien de causalité entre l'événement indésirable grave et les médicaments expérimentaux et les traitements associés. Il évalue si l'effet indésirable est attendu ou inattendu.

Il déclare dans les délais réglementaires tous les effets indésirables graves et inattendus (**EIGI**) à Eudravigilance, à l'autorité compétente (France : ANSM) et au CPP et informe les investigateurs.

Il déclare à l'ANSM et au CPP les faits nouveaux et leur adresse un rapport annuel de sécurité.

10.4 Modalités et délai de déclaration des événements indésirables graves :

Afin de respecter la réglementation en vigueur concernant la déclaration des événements indésirables graves à l'autorité compétente, l'investigateur s'engage à documenter l'événement, à respecter les délais de notification, à fournir toutes les informations

nécessaires à l'analyse de cet événement.

10.4.1 Modalités de déclaration:

Tout événement indésirable grave (EIG) doit être déclaré au DRCT par l'investigateur quelle que soit sa relation de causalité avec le(s) traitement(s) de l'essai ou la recherche dès qu'il en a connaissance **dans les 24 heures calendaires** par fax **ET** par téléphone au :

Responsable de la Mission Réglementation et Qualité et recherche clinique (RQRC)

Fax : 01 44 23 67 10 Tél : 06 85 36 09 50 E-mail : beatrice.barraud@inserm.fr

CIC de Grenoble

A l'attention de : Adeline Paris Fax : 04-76-76-92-62 E-mail : AParis@chu-grenoble.fr

A l'aide du feuillet de la déclaration initial d'événement indésirable grave.

Il adresse également les copies des résultats de laboratoire ou des comptes rendus d'examens ou d'hospitalisation renseignant l'événement grave, sans omettre de rendre les documents anonymes et d'inscrire le numéro d'identification du patient dans l'essai.

10.4.2 Suivi des patients en cas de survenue d'un événement indésirable grave

Après sa notification initiale, l'EIG doit obligatoirement faire l'objet d'un suivi jusqu'à sa résolution. L'investigateur doit recueillir toute information complémentaire relative à l'EIG dès qu'il en a connaissance sur le formulaire de déclaration complémentaire d'un événement indésirable grave annexé au cahier d'observation et le faxer ainsi que les résultats de laboratoires ou les comptes rendus d'hospitalisation dans les **24 heures au DRCT** et au CIC de Grenoble

10.4.3 Délais

Tout EIG doit être déclaré, s'il survient pour un patient :

- à partir de la date de signature du consentement,
- pendant toute la durée de suivi du participant prévue par l'essai,
- jusqu'à 30 jours après la fin du suivi du participant prévue par l'essai, lorsqu'il est dû à la recherche, sans limitation de durée lorsqu'il est susceptible d'être dû au médicament expérimental (il s'agit par exemple des effets graves pouvant apparaître à grande distance de l'exposition au médicament, tels que les cancers ou les anomalies congénitales).

10.4.4 Rapport annuel de sécurité (RAS) :

A la date anniversaire de l'autorisation d'essai par l'ANSM, le promoteur rédige un rapport de sécurité comprenant :

- le listing des effets indésirables graves susceptibles d'être liés aux médicaments expérimentés dans l'essai incluant les EIG inattendus et attendus.
- une analyse concise et critique de la sécurité des patients se prêtant à la recherche. Ce rapport est validé par l'investigateur coordonnateur.

10.5 Autres événements à notifier

10.5.1 Grossesse L'investigateur en charge du suivi de la patiente doit notifier toute grossesse par fax au :

Responsable de la Mission Réglementation et Qualité et recherche clinique (RQRC)

Fax : 01 44 23 67 10 Tél : 06 85 36 09 50 E-mail : beatrice.barraud@inserm.fr

CIC de Grenoble

A l'attention de : Adeline Paris Fax : 04-76-76-92-62 E-mail : AParis@chu-grenoble.fr

Dès qu'il en a connaissance, au moyen d'un formulaire de recueil des données initiales de la

grossesse. Ce formulaire doit contenir les coordonnées de l'obstétricien et de la maternité prévue pour l'accouchement.

Le DRCT déclare la grossesse dans les 48 heures au service de pharmacovigilance de l'ANRS.

A l'issue de la grossesse, le responsable de la RQRC, en collaboration avec le chef de projet DRCT envoie à l'investigateur en charge du suivi de la patiente un formulaire de recueil des données finales de la grossesse (modèle selon procédures du promoteur). L'investigateur la complète en collaboration avec l'obstétricien et la renvoie au DRCT et au CIC de Grenoble.

Les feuillets sont ensuite adressés aux services de pharmacovigilance de l'ANRS.

Attention : toute interruption volontaire de grossesse (IVG), interruption thérapeutique de grossesse (ITG) ou fausse couche doit faire l'objet d'une déclaration de grossesse et si elle a nécessité une hospitalisation

10.6 Evénement non graves

Les événements indésirables non graves seront reportés dans le cahier d'observation, ils feront l'objet d'un suivi jusqu'à résolution. L'investigateur jugera de la causalité aux médicaments de l'essai et à la pathologie. Le degré de gravité d'un événement indésirable biologique sera apprécié sur 2 prélèvements aussi rapprochés que possible.

10.7 Faits nouveaux

Tout fait nouveau fera l'objet d'une information à l'ANSM et au CPP Sud-EstV. Le formulaire d'information et de consentement sera modifié en conséquence.

10.8 Comité de surveillance de la sécurité de l'étude

Un comité de surveillance de la sécurité de l'étude est constitué avant le début de l'étude. Il

doit être indépendant du promoteur et des investigateurs. Ses membres doivent, sur la base des résultats de tolérance rapportés, conseiller au promoteur et à l'investigateur coordonnateur, soit d'interrompre prématurément l'étude, soit de la poursuivre avec si nécessaire une modification du protocole. Le comité de surveillance de la sécurité de l'étude, interviendra selon la procédure précédemment décrite. Le comité de surveillance de la sécurité de l'étude sera constitué des membres suivants :

Nom, Prénom	Compétences	Lieu d'exercice professionnel
CRACOWSKI Jean-Luc	Médecin, pharmacologue	CIC CHU de Grenoble
VILLIER Céline	Pharmacien de pharmacovigilance	Service de Pharmacovigilance CHU de Grenoble
CREPIN-GALLAZZINI Céline	Médecin de médecine nucléaire	Service de Médecine Nucléaire CHU de Grenoble

11 RECUEIL ET TRAITEMENT DES DONNEES

11.1 Définitions et méthodes de mesure.

11.1.1 Paramètres cliniques

Fréquence cardiaque : DRÄGER INFINITY GAMMA XL®

Tension artérielle : DRÄGER INFINITY GAMMA XL®

Poids : Balance électronique

Taille : Toise manuelle

11.1.2 Paramètres para-cliniques

- Electrocardiogramme :

Au CIC : AGILENT, M3046A – M30000A

En cardiologie : PHILIPS PageWriter 200

En médecine nucléaire : CASE8000 (ECG d'épreuve d'effort), General Electric® (n° de série : C20G03295)

- Appareil scintigraphie : gamma caméra General Electric® de type Infinia; (n° de série 17332), puis stockage des données sur CD ROM via le système de gravure CD/DDV de marque Keosys, type visio plus storage (n° de série 07110101).

11.1.3 Paramètres biologiques

Dosages sanguins :

- La numération sanguine :

→ L'hémoglobine est mesurée par une méthode spectrophotométrique après lyse des hématies.

→ Les globules rouges, leucocytes et plaquettes sont mesurés par impédancemétrie.

→ Le Volume Globulaire Moyen (VGM) est mesuré par impédancemétrie (technique Coulter).

→ L'hématocrite, la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH), et la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH) sont calculés.

- Le sodium est mesuré par une méthode potentiométrique directe ou indirecte.

- Le potassium est mesuré par une méthode potentiométrique directe ou indirecte.

- La créatinine est mesurée par une méthode de colorimétrie cinétique ou enzymatique.

- L'urée est mesurée par une méthode de colorimétrie enzymatique.
- La bilirubine totale est mesurée par une méthode de colorimétrie enzymatique.
- Les ASAT et ALAT sont mesurées par spectrophotométrie.
- Les PAL sont mesurées par coloration cytochimique.
- Les GGT sont mesurées par spectrophotométrie.
- Le TCA et le TP sont mesurés par des méthodes chronométriques.
- Le bilan lipidique (cholestérol total, HDL et LDL, triglycérides) est réalisé avec une méthode colorimétrique automatisée.
- L'adiponectine est mesurée par une méthode de radio-immunologie. - Le glucose est mesuré soit par une méthode de colorimétrie enzymatique au DBI, soit avec le lecteur de glycémie Accu-Chek Sensor® par une méthode de colorimétrie avec lecture par photométrie
- L'insuline est mesurée par une méthode radio-immunologique manuelle - L'hémoglobine glyquée (HbA1c) est mesurée par une méthode de chromatographie liquide (HPLC). - Comptage radioactif du 6-DIG : compteur gamma COBRA 5003 Packard (N° série : 103830).

Dosages urinaires :

- Protéine, glucose, leucocytes, hématies et pH sont détectés avec une bandelette urinaire.
- La microalbuminurie sera mesurée par immunoprécipitation (Néphélomètre BN II Dade/Behring(Siemens)). - Comptage radioactif du 6-DIG : compteur gamma COBRA 5003 Packard (N° série : 103830) - Dosimétrie du 6-DIG : logiciel MIRDose 3 (Oak Ridge Institute for Science and Education, USA, Version 3.0a, 1994).

Dosages dans les selles :

- Comptage radioactif du 6-DIG : compteur gamma ARIES (N° série : 9144000036) pour les selles - Dosimétrie du 6-DIG : logiciel OLINDA/EXM (Organ Level Internal Dose Assessment/ EXponential Modeling).

11.2 Données cliniques recueillies uniquement dans le cahier d'observation

En dehors de l'examen clinique prévu dans le cadre de l'étude, l'ensemble des données décrites ci- dessous sera inscrit directement dans le cahier d'observation de l'étude.

11.3 Circuit des données avant la saisie informatique

Les cahiers d'observation seront remplis et signés par l'investigateur. Par son accord de participation, l'investigateur s'engage au strict respect du protocole expérimental, des "Bonnes Pratiques Cliniques" et de la législation en vigueur. Il se porte garant de l'authenticité des données recueillies dans le cadre de l'étude et accepte les dispositions légales autorisant le promoteur de l'étude à mettre en place un contrôle de la qualité. L'analyse statistique ne sera effectuée qu'après vérification de la saisie et de la cohérence des données. Les données seront archivées par l'investigateur coordonnateur.

11.4 Saisie informatique des données

Le CIC réalisera la saisie des données. Une base de données anonymes sera créée et sauvegardée sur un serveur (sauvegarde journalière). Les sujets seront identifiés uniquement par un n° et un identifiant. Une simple saisie avec contrôle externe sera réalisée.

11.5 Gestion et conditions d'archivage des documents de l'essai

Pendant l'essai, les documents seront archivés au CIC de Grenoble et dans le service de biophysique et médecine nucléaire du CHU de Grenoble. Après l'essai, l'ensemble des dossiers de l'étude sera archivé pour une durée de 15 ans, sous la responsabilité du promoteur. Les documents source, les cahiers d'observation, les originaux des formulaires de consentement, le protocole signé devront être conservés par l'investigateur coordonnateur pendant la durée minimale de 15 ans à compter de la fin de l'étude. Le coordonnateur organise, au nom du promoteur de l'étude, le stockage dans des locaux appropriés les documents suivants :

- Protocole avec annexes, amendements.
- Cahiers d'observation (originaux) avec documents annexes.
- Document de suivi de l'étude clinique.
- Toutes les pièces administratives et correspondances liées à l'étude.
- Rapport d'étude.

Ces documents seront archivés soit dans le service du coordonnateur, soit aux Archives centrales du CHU de Grenoble.

11.6 Présentation des autres supports de recueil de données

Les données sources seront recueillies dans le dossier médical informatique ou papier des volontaires en médecine nucléaire et certaines d'entre elles figureront sur un CD-Rom. Le dossier de cardiologie pour les diabétiques, ainsi que le dossier du CIC pour tous les sujets seront également des supports de données sources.

12 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

12.1 Calcul d'effectif

S'agissant d'une première administration à l'homme, aucune donnée n'est disponible pour calculer le nombre de sujets à inclure. Nous avons choisi d'inclure 6 sujets sains et 6 diabétiques de type 2. Cet effectif permettra, outre l'évaluation de la tolérance du produit, l'étude de la reproductibilité et de la faisabilité chez les volontaires sains et une première évaluation de l'efficacité chez les diabétiques. Nous prévoyons cependant d'avoir à inclure au maximum 8 patients sains et 8 patients diabétiques de type 2 pour anticiper d'éventuelles sorties d'étude prématurées.

Les diabétiques de type 2 seront appariés en âge avec les sujets sains.

12.2 Description du plan d'analyse statistique

Seuil Statistique et conditions d'applications :

Lors d'un test, le seuil statistique (α) retenu pour considérer une différence comme statistiquement significative sera p inférieur ou égal à 0,05. On mettra en œuvre le test de Shapiro-Wilks pour démontrer la normalité des paramètres.

Variables Quantitatives

Les paramètres quantitatifs pour lesquels la normalité aura été admise seront décrits par la moyenne $\pm$ écart-type, l'intervalle de confiance à 95% ainsi que les 5ème et 95ème percentiles. Ils seront exprimés en médiane, minimum, maximum et les 5ème et 95ème percentiles lorsque la normalité aura été rejetée.

Variables Qualitatives

Les paramètres qualitatifs seront exprimés en effectif et pourcentage encadré par un intervalle de confiance à 95 %.

Populations d'analyse : L'analyse descriptive des paramètres sera réalisée sur la population en intention de traiter. L'analyse comparative sera réalisée sur la population constituée des sujets inclus ayant reçu la dose adéquate de traitement (6-DIG) et pour lesquels le critère principal sera disponible. Aucune méthode de remplacement de données ne sera mise en œuvre.

Comité de pilotage de l'étude

Le comité de pilotage tel que précédemment défini aura pour missions dans le cadre de l'analyse statistique :

- De statuer sur l'inclusion des sujets.
- De valider l'ensemble des données.
- De piloter l'étude statistique.
- De décider des analyses supplémentaires pouvant être réalisées.

Analyse du critère principal

- Objectif :

Evaluer la tolérance de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez les volontaires sains et les diabétiques.

- Paramètres :

S'agissant d'une étude de tolérance, le critère de jugement combiné reprendra le recueil des événements indésirables survenus suite à l'injection unique, la surveillance de la tension artérielle et de la fréquence cardiaque, les données électrocardiographiques, les données biologiques sanguines, urinaires, scintigraphie.

Méthode d'analyse :

Les effets secondaires dans chaque groupe seront décrits par type d'événement indésirable et l'on exprimera leur fréquence par leur effectif et le pourcentage correspondant encadré par un intervalle de confiance à 95 %. La mise en évidence d'une différence de répartition des effets secondaires globaux (répartition des fréquences d'événements), entre groupes sera obtenue à l'aide du test d'indépendance du khi-deux. Lorsque ce test ne pourra pas être mis en œuvre, le test Exact de Fisher sera réalisé.

Analyse des critères secondaires

- Objectif 2:

Evaluer la faisabilité de la technique chez les volontaires sains et les diabétiques.

Paramètres :

Données de sécurité, dosages biologiques, scintigraphie

Méthode d'analyse :

Une analyse descriptive des paramètres de sécurité, dosages biologiques et scintigraphie sera réalisée.

- Objectif 3:

Etudier la pharmacocinétique du 6-DIG chez les volontaires sains et les diabétiques.

Paramètres :

Recueils urinaires et des selles sur 24 heures, scintigraphies dynamiques de 0 à 1H, puis corps entier à 1H, 2H, 4H, 8H et 24H. L'activité des prélèvements sanguins est mesurée ainsi que l'activité plasmatique après centrifugation. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123.

L'activité dans les urines est mesurée à différents temps : 0 à 2h ; 2h à 4h; 4h à 8h; 8h à 12h et 12h à 24h après injection. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123. A partir des images scintigraphiques corps entier, les régions d'intérêt seront réalisées pour identifier les différents organes et obtenir une évolution temporelle de l'activité dans chacun de ceux-ci. Les résultats seront exprimés en pourcentage de l'activité injectée après correction de la décroissance radioactive de l'Iode 123.

La dosimétrie des différents organes sera calculée à partir du logiciel OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment).

Méthode d'analyse :

On testera les différences des paramètres quantitatifs par un modèle type ANOVA à mesures

répétées après vérifications des conditions d'applications.

- Objectif 4:

Efficacité du 6-DIG pour la mesure de l'insulinorésistance chez les volontaires sains et les diabétiques.

Paramètres :

Scintigraphie.

Méthode d'analyse :

La mesure de l'insulinorésistance cardiaque sera réalisée chez les sujets sains puis chez les diabétiques en utilisant les données des acquisitions dynamiques scintigraphie et les méthodes de mesure validées chez l'animal (Modèle à 3 compartiments et le descripteur empirique).

- Objectif 5:

Evaluer la reproductibilité de la technique chez les volontaires sains.

Paramètres :

Comparaison des résultats chez les volontaires sains à 1 semaine d'intervalle.

Méthode d'analyse :

La variabilité entre les paramètres K (2,1) basal et insuline sera comparée par un test de Wilcoxon.

La variabilité des paramètres K (2,1) basal et insuline entre les deux groupes (volontaires vs diabétiques) sera étudié par un test de Mann-Whitney. La limite de significativité est fixée à 5% ($p < 0,05$). La comparaison de la reproductibilité inter-test sera jugée par une analyse du paramètre K (2,1) basal mesuré chez 3 volontaires sains à 1 semaine d'intervalle (test de Wilcoxon).

Autres Analyses

Des analyses complémentaires permettant des ajustements sur des cofacteurs pourront être envisagées à posteriori à titre informatif.

Analyse(s) intermédiaire(s)

Aucune analyse intermédiaire n'est envisagée.

12.3 Résultats attendus

Il est attendu de cette étude la démonstration de la bonne tolérance du 6-DIG. Elle devrait également permettre de démontrer la faisabilité de l'injection du 6-DIG et de son utilisation pour la mesure de l'insulinorésistance chez l'homme.

Résultats

1^{ère} Partie :

Etude de phase 1

1. Caractéristiques de la population

L'étude a porté sur 6 volontaires sains (3 femmes utilisant une contraception et 3 hommes). L'âge moyen était de 47 ± 6 ans [38 – 54 ans], la taille moyenne de $171 \pm 11,6$ cm [157 – 188 cm], le poids moyen de $70 \pm 10,5$ Kg [60,5 – 84 Kg], pour un Indice de Masse Corporelle de $23,6 \pm 1,3$ Kg/m² [21,9 - 25 Kg/ m²]. La glycémie sanguine moyenne à jeun était à $4,6 \pm 0,4$ mmol/l [4,1- 5,3 mmol/l], avec une HbA1C à $5,4 \pm 0,2\%$ [5,1- 5,6%].

Six diabétiques de type 2 (1 femme et 5 hommes) ont pu être investigués. L'âge moyen était de $52 \pm 7,4$ ans [39 – 60 ans], la taille moyenne de 167 ± 17 cm [135 – 186 cm], le poids moyen de 85 ± 13 Kg [65 – 105 Kg], pour un Indice de Masse Corporelle de $30,4 \pm 3,8$ Kg/m² [26 – 36 Kg/ m²]. La glycémie sanguine moyenne à jeun était à $7,03 \pm 0,4$ mmol/l [6,6 - 7 mmol/l], avec une HbA1C à $6,68 \pm 0,5\%$ [6,2 - 7,6%].

2. Stabilité

Il a été montré que la molécule marquée restait stable in vitro pendant au moins 60 jours. La stabilité de la molécule a été vérifiée après chaque nouveau marquage et régulièrement par la suite par chromatographie liquide haute performance (CLHP, Shimadzu, phase solide RP18, éluant : eau, débit : 7ml/min). La figure 1 montre la stabilité du 6DIG environ 60 jours après marquage. Sur cette figure, les deux pics les plus importants correspondent au 6DIG. Ils correspondent aux anomères α et β de la molécule de glucose.

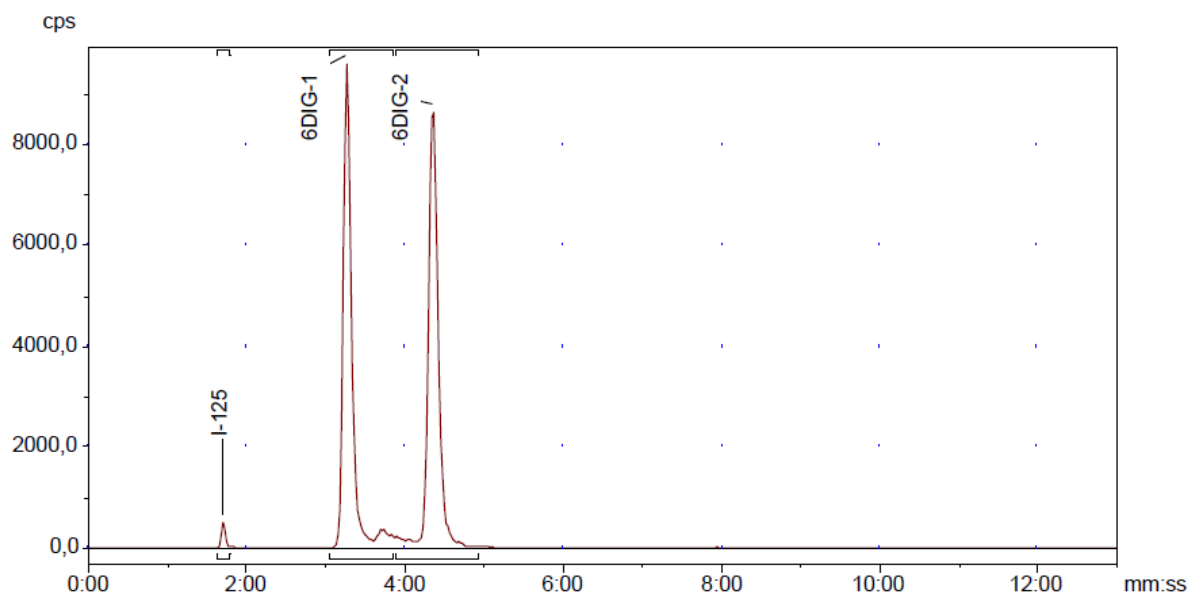
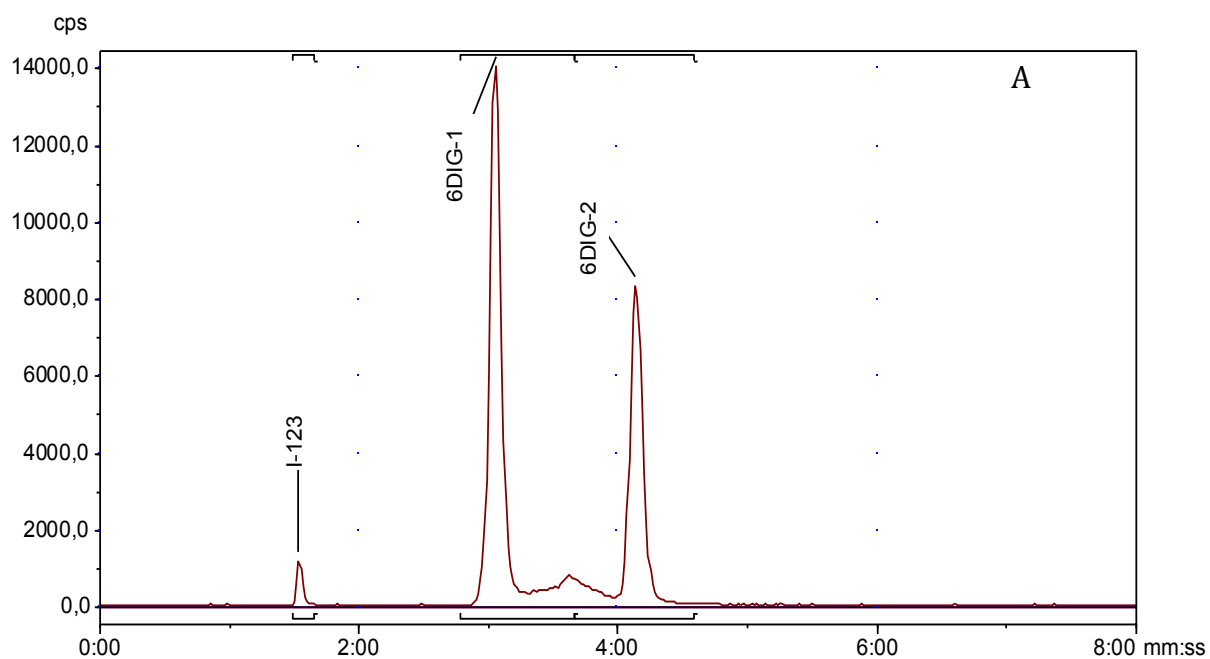


Figure 23. Stabilité du 6DIG 60 jours après marquage (Colonne : C18 waters spherisorbe 5 μ m ODS2, éluant : H₂O pure). Les 2 pics représentés sont caractéristiques du 6-DIG, ils correspondent aux deux formes de la molécule (α et β) qui ne sont pas éluées à la même vitesse.

L'étude in vivo du métabolisme du 6DIG chez l'homme a mis en évidence les mêmes pics retrouvés in vitro (Figure 2). Aucune différence n'a été notée entre les patients sains et diabétiques.



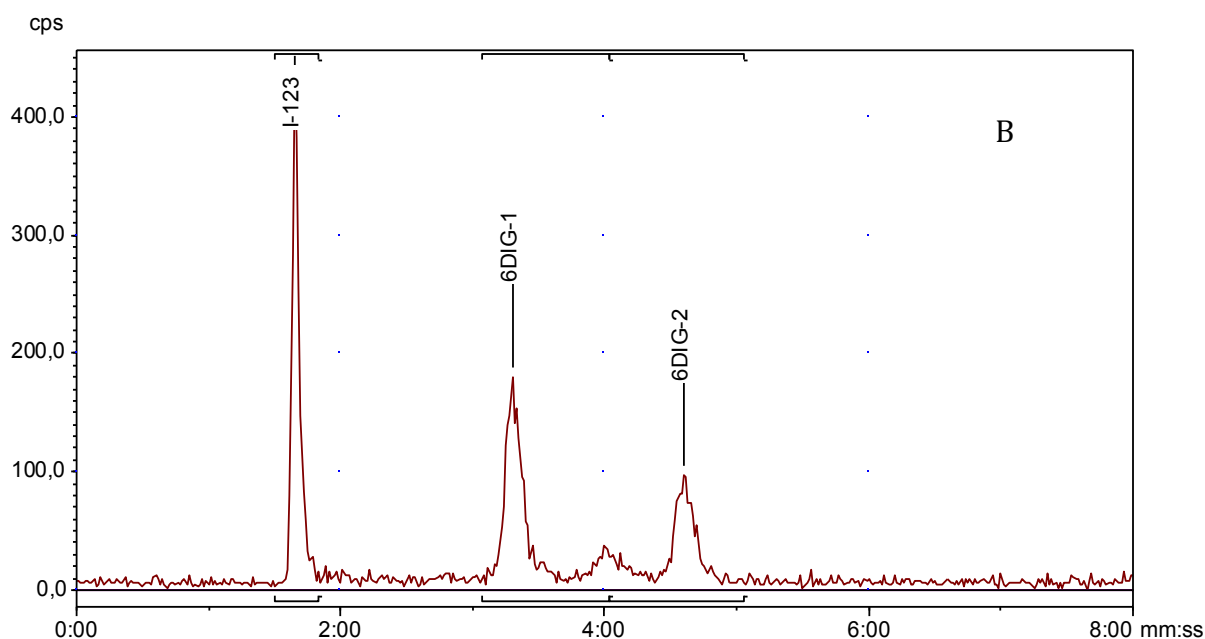


Figure 24. Etude in vivo du métabolisme du 6DIG chez l'homme. Les prélèvements sanguins (A) et urinaires (B) ont été réalisés 45 minutes après l'injection du traceur. Le sérum a été purifié par ultracentrifugation (Etude CLHP colonne C18, phase mobile aqueuse).

La stabilité dans le sang et dans les urines a été étudiée en fin de protocole de mesure de l'IR avec le 6DIG. L'analyse dans le plasma de la stabilité du 6-DIG montre qu'à 5 min, 10 min, 25 min, 1 h et 4h, les pourcentages de la dose injectée (DI) représentés par l'iode libre sont respectivement de $12,68 \pm 2,95$; $15,45 \pm 4,68$; $16,25 \pm 3,78$; $26,88 \pm 4,35$; 100. L'analyse dans les urines de la stabilité du 6-DIG montre qu'à 2 h, 4 h, 8 h et 24h, les pourcentages de la DI représentés par l'iode libre sont respectivement de $37 \pm 9,5$; $49 \pm 18,3$; $93 \pm 18,3$; 100. Aucun métabolite n'a été retrouvé dans les urines ou le plasma.

3. Paramètres de surveillance

Aucun effet indésirable n'a été rapporté dans les 48 h suivant l'injection de 6-DIG. Aucune modification des paramètres vitaux (FC, PA), de l'examen clinique, des ECG, ni des paramètres biologiques n'a été observée.

Par ailleurs, l'injection d'insuline a été très bien tolérée par l'ensemble des sujets avec des signes d'hypoglycémie légers comme une sensation de faim ou de fatigue totalement réversibles après resucrage.

4. Pharmacocinétique

Clairance sanguine

L'activité du 6-DIG décroît rapidement dans le sang pour atteindre 12% de la dose injectée à 1 heure post injection. Ensuite l'activité du 6-DIG décroît progressivement en fonction du temps, puisque moins de 3% de la DI persiste 24 heures après l'injection. La clairance plasmatique du 6-DIG suit la clairance sanguine avec une clairance plasmatique de $9,23 \pm 8,95$ %DI à 5 min et de $2,81 \pm 1,86$ %DI à 24 heures.

Clairance urinaire

L'élimination urinaire du 6-DIG est rapide et est montrée sur la [figure 25](#). L'élimination cumulée sur 24 heures étant de $51,39 \pm 7,29$ % DI. Au-delà de 8h, l'activité mesurée correspond surtout à de l'iode libre.

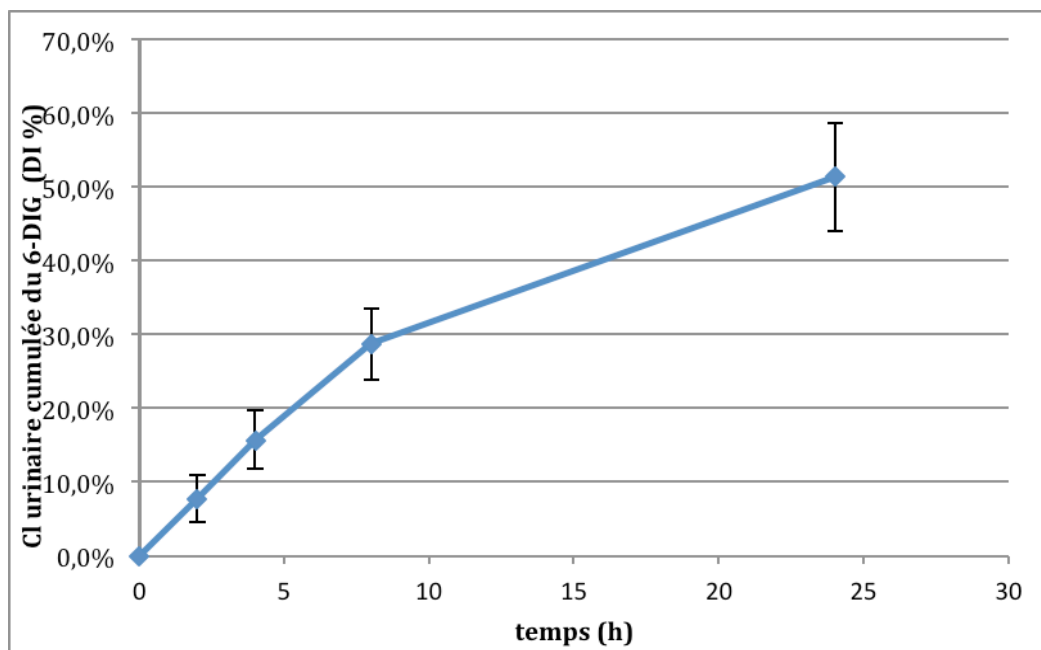


Figure 25 : Clairance urinaire cumulée du 6-DIG les 24 premières heures (moyenne $\pm$ SD).

DI : Dose injectée

5. Biodistribution

- ◆ La Biodistribution du 6-DIG dans les 24 premières heures pour les différents organes est présentée dans le [tableau 12](#), la [figure 26](#) représentant les images des scintigraphies « corps entier » en vue antérieure après injection du 6-DIG à 1, 2, 4 et 24 heures.

Organes	15 min	1 h	2h	4h	8h	24h
Cœur	1,5 ± 1,91	1,81 ± 1,44	1,36 ± 1,36	0,18 ± 0,55	0	0
Poumon	0	0	0	0	0	0
Thyroïde	0,12 ± 0,22	0,47 ± 0,44	0,84 ± 0,23	0,85 ± 0,22	1,24 ± 1,09	0,61 ± 0,24
Cerveau	0	0	0	0	0	0
Foie	4,2 ± 2,65	2,65 ± 1,89	5,13± 1,52	3,83± 1,16	0 ± 0,23	0
Vessie	2,03 ± 0,88	3,92± 1,42	4,02± 1,31	3,1 ± 1,82	1,33 ± 0,69	0,78 ± 0,5
Rein	0,73 ± 0,37	1,07± 0,4	1,12± 0,65	0,63 ± 0,64	0,16 ± 0,33	0
Rate	0,4 ± 0,78	0,33± 0,65	0,46± 0,48	0	0	0
Muscles	0	0	0	0	0	0
Organes génitaux	0	0	0	0	0	0
Intestin	0	0	0	0	0	0
Estomac	0	0	0	3,4± 1,13	2,98±1,42	0,85±0,69
Reste du corps	56,2± 20,1	87,6±2,92	83,6± 9,21	60,2± 5,17	37 ± 6,01	7,42± 5,92

Tableau 12 : Biodistribution du 6DIG durant les 24 premières heures après l'injection du traceur.

Les résultats sont exprimés en % de la dose injectée ± SD

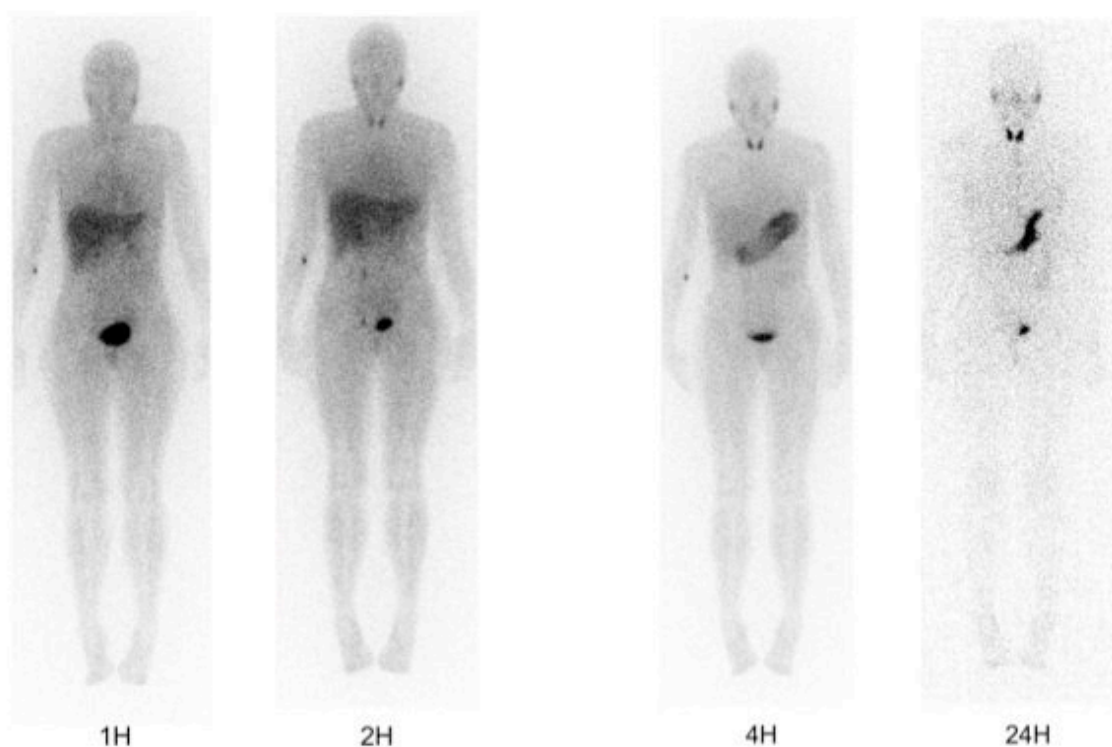


Figure 26 : Scintigraphie corps entier en vue antérieure après injection du 6-DIG à 1, 2, 4 et 24 heures.

6. Elimination du 6-DIG

L'activité corps entier corrigée de la décroissance du 6-DIG est constante de 0 à 24 heures, témoignant d'une élimination lente du 6-DIG durant cette période. L'élimination urinaire du 6-DIG est de $51,39 \pm 7,29$ % DI sur les 24 premières heures. Si l'on y rajoute le pourcentage de la DI mesuré dans le colon à la 24ème heure – soit $9,33 \pm 15,7$ % DI – l'élimination totale du 6-DIG dans les 24 premières heures peut être estimée à 60%DI.

7. Dosimétrie

Le [tableau 13](#) montre les résultats de dosimétrie pour les principaux organes captant le 6-DIG. Pour une exploration cardiaque complète avec injection de 92,5 MBq à l'état basal puis de 92,5 MBq après injection d'insuline, la dose efficace est de 3 à 4 mSv.

	Dose totale mGy/ MBq	
	Moyenne	Écart-type
surrénales	1,18E-02	2,62E-03
cerveau	8,96E-03	1,89E-03
seins	7,51E-03	1,65E-03
paroi vésicule biliaire	1,22E-02	2,58E-03
paroi digestive basse	1,28E-02	2,91E-03
Intestin grêle	1,17E-02	2,21E-03
estomac	3,28E-02	1,08E-02
paroi digestive haute	1,23E-02	2,72E-03
myocarde	1,19E-02	2,26E-03
reins	1,11E-02	4,66E-03
foie	1,12E-02	3,22E-03
poumons	1,06E-02	2,40E-03
muscles	9,58E-03	2,01E-03
ovaires	1,40E-02	2,28E-03
pancréas	1,43E-02	3,19E-03
moelle osseuse	8,69E-03	1,80E-03
os	3,22E-02	7,11E-03
peau	6,57E-03	1,36E-03
rate	1,11E-02	4,25E-03
testicules	7,21E-03	4,67E-04
thymus	1,02E-02	2,25E-03
la thyroïde	1,92E-01	8,12E-02
Paroi vésicale	4,44E-02	1,85E-02
utérus	1,41E-02	3,31E-03
corps entier	1,03E-02	2,16E-03
Dose efficace mSv/MBq	2,39E-02	4,21E-03

Tableau 13 : Dosimétrie

8. Discussion

L'administration du 6-DIG chez le volontaire sain s'est avérée parfaitement bien tolérée, puisqu'aucun effet indésirable n'a été rapporté et qu'aucune modification des paramètres de surveillance, aussi bien cliniques, qu'électrocardiographiques et biologiques n'a été enregistrée. Aucune toxicité hépatique ou rénale n'a été mise en évidence. La tolérance hématologique est également bonne.

L'administration d'iodure de potassium a été bien tolérée sans effet secondaire permettant une diminution nette de la captation thyroïdienne, avec 1,24 % de la DI fixé à la huitième heure.

Les hypoglycémies provoquées par l'injection d'insuline n'ont entraîné aucun effet secondaire néfaste. Nous avons noté uniquement des signes d'hypoglycémie mineurs (fatigue, sensation de faim) réversibles après resucrage. D'après les premières données de la cinétique de transfert du 6-DIG dans le myocarde après injection de l'insuline, il semblerait que ce transfert soit réalisé quelques minutes après l'injection d'insuline (10 minutes) permettant de ne pas attendre l'apparition des signes d'hypoglycémie avant le resucrage, en effet ceux-ci arrivant entre 30 et 45 minutes après l'injection de l'insuline.

L'étude de la biodistribution montre que le 6-DIG a une fixation non spécifique d'organe. La clairance dans le sang témoigne d'un faible taux d'extraction tissulaire, les principaux organes captant la molécule étant les organes d'élimination (estomac, foie, vessie).

La captation cardiaque est faible ainsi que celle des autres organes, puisque moins de 2% de la DI est obtenue à la première heure pour le cœur. La clairance cardiaque est rapide, avec la persistance de moins de 10% de la DI% maximale captée par le cœur à la quatrième heure post-injection.

Les études chez l'animal ont montré que le transport intracellulaire du 6-DIG par les transporteurs GLUT était rapide. Le 6-DIG non métabolisé dans les cellules myocardiques peut ensuite rapidement ressortir par les mêmes transporteurs et retourner dans le compartiment sanguin. Ainsi, les échanges entre le sang et le myocarde sont réalisés dans les premières minutes puisqu'un équilibre intra et extracellulaire est obtenu, expliquant que plus

de 80% de la DI est retrouvée dans le reste du corps sans qu'aucun organe, sauf les organes d'élimination, ne puisse présenter une fixation importante du 6-DIG.

L'élimination du 6DIG est rapide, estimée à 61 % de la DI dans les 24 heures. Celle ci est principalement urinaire pour près de 50%.

En ce qui concerne la dosimétrie, nos résultats montrent que le 6-DIG entraîne une dose absorbée par le patient pour une exploration complète de 3 à 4 mSv. La dosimétrie est relativement basse mais reste élevée pour le développement d'un test d'insulinorésistance dans une perspective du dépistage de masse. Ce test sera par contre des plus intéressants pour l'évaluation de l'insulinorésistance cardiaque dans une population déjà identifiée comme à risque. Ainsi la mesure précoce de l'insulinorésistance cardiaque pourrait avoir un intérêt chez les patients en surpoids pour identifier les patients les plus à risque de développer un diabète de type 2. Cette méthode pourrait permettre aussi de mieux identifier les patients à risque cardiovasculaire élevé parmi les patients présentant un syndrome métabolique, un diabète de type 2 ou enfin une coronaropathie avérée.

En conclusion l'étude de phase 1 confirme la facilité d'emploi et l'innocuité du 6-DIG, ainsi qu'une biodistribution et une pharmacocinétique adaptées à la réalisation d'une mesure de l'insulinorésistance cardiaque.

2ème Partie : Mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque

1. Introduction

L'insulinorésistance (IR), est associée à de nombreuses anomalies métaboliques dont le surpoids et l'obésité qui affectent plus d'un milliard de personnes dans le monde. Elle est aussi au centre de la physiopathologie du syndrome métabolique et contribue au développement du diabète de type 2 et à l'apparition de maladies cardiovasculaires. Or actuellement, aucune technique n'est assez précise et peu contraignante pour avoir une application en routine clinique pour le développement de nouvelles méthodes diagnostique, pronostique et thérapeutique. En effet, ces techniques sont soit trop contraignantes, comme la méthode de référence le clamp euglycémique hyperinsulinémique, soit peu reproductibles et peu informatives comme l'HOMA et le QUICKI. De plus elles ne permettent pas la mesure de la sensibilité à l'insuline de façon régionale.

C'est dans ce cadre que la technique de mesure de l'IR cardiaque avec le 6-DIG en utilisant une modélisation mathématique du transport du 6-DIG dans le cœur a été développée.

2. Matériel et méthodes

Les patients sont placés sous un appareil scintigraphie (Gamma caméra General Electric® de type Infinia) avec deux voies veineuses périphériques, l'une permettant l'injection du 6DIG et de l'insuline, la deuxième permettant les prélèvements sanguins.

Une acquisition dynamique de 15 minutes est réalisée à l'état basal après l'injection de 92,5 MBq de 6-DIG puis une deuxième acquisition dynamique de 15 minutes est réalisée après une nouvelle injection de 92,5 MBq de 6-DIG et de l'insuline à la dose de 0,15 U/kg si $IMC < 25$ kg/m² et 0,20 U/kg si $IMC \geq 25$ kg/m² selon le protocole. La [figure 27](#) résume le protocole d'acquisition.

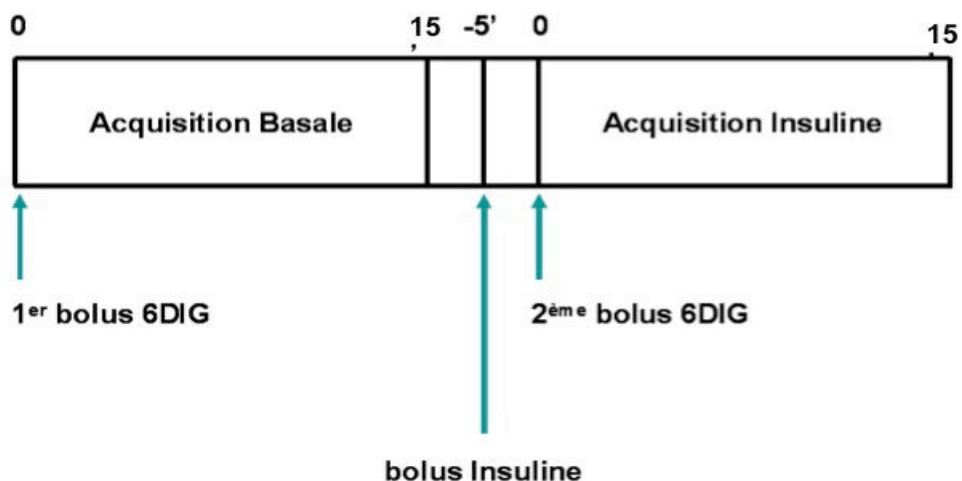


Figure 27 : Protocole scintigraphique pour la mesure de l'insulinorésistance dans le cœur.

Sur les séquences dynamiques est déterminée de façon manuelle une région d'intérêt (ROI) sur le cœur et l'aorte initiale, en se basant sur les images aux temps courts de l'acquisition (Figure 28).

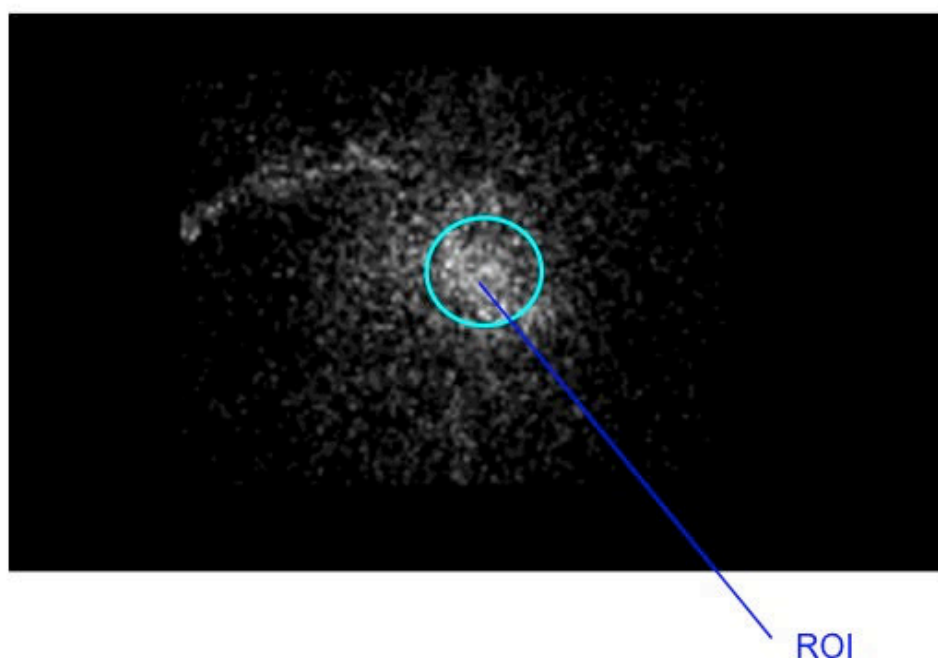


Figure 28 : Acquisition d'image du 6-DIG au niveau du cœur

L'index IR cardiaque est ensuite calculé à l'aide du modèle mathématique. En effet l'étude du transport du glucose avec un traceur requiert l'utilisation d'une modélisation mathématique compartimentale. Ce modèle mathématique de transport du 6DIG a été développé chez l'animal par le Dr. Lotfi Slimani au cours de sa thèse d'université, sous la direction scientifique du Pr. J. Demongeot (UMR CNRS 5525, Grenoble) (Slimani, 2002) et a été appliqué à l'homme. Ce modèle, développé à l'aide du module "compartimental" du logiciel SAAM II (Simulation, Analysis And Modeling institute, Seattle, WA, 1997), permet de quantifier le transport du traceur à partir des données biologiques obtenues après l'injection du 6DIG *in vivo* chez l'homme, par détection externe de la radioactivité. Ce modèle comprend trois compartiments : le cœur, le sang et les tissus périphériques (Figure 29).

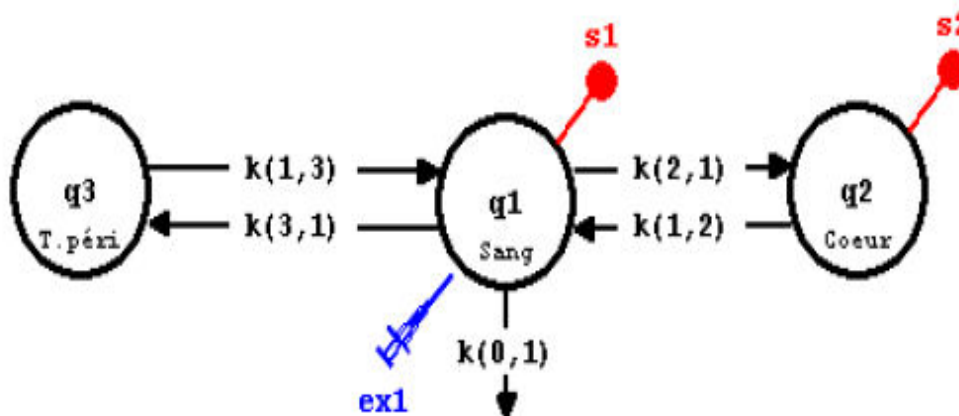


Figure 29 : Modèle mathématique à trois compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le coeur, chez l'homme *in vivo*, par détection externe de la radioactivité.

Ce modèle comporte une fonction d'entrée au niveau du compartiment sanguin (ex1) et deux fonctions d'observation, l'une au niveau du compartiment sanguin (s1) (figure 31) et la seconde au niveau du compartiment cardiaque (s2) (figure 32). Les constantes k représentent les coefficients de transfert entre deux compartiments, $s1=q1/V$, avec V représentant le

volume de sang total et $s_2 = q_2/M$, avec M représentant la masse du cœur ; les échanges entre compartiments sont supposés linéaires. Les coefficients de transfert $k_{(2,1)}$ et $k_{(1,2)}$ représentent respectivement le flux de 6DIG du sang vers le cœur et du cœur vers le sang. Les coefficients de transfert $k_{(3,1)}$ et $k_{(1,3)}$ représentent respectivement le flux de 6DIG du sang vers les organes périphériques et de ces organes vers le sang. Le coefficient de transfert $k_{(0,1)}$ représente la fuite irréversible du traceur, principalement urinaire.

Le transport du glucose à travers la membrane d'un compartiment j à un compartiment i est représenté par les coefficients de transfert k_{ij} . Ces coefficients sont décrits par l'équation :

$$k_{ij} = V_{mi} / (K_{mi} + q_i) \quad \text{et} \quad k_{ji} = V_{mj} / (K_{mj} + q_j)$$

q_i et q_j sont les quantités de traceur dans les compartiments i et j , K_{mi} et K_{mj} sont les constantes de Michaelis et V_{mi} et V_{mj} les vitesses maximales.

Comme $q_i \ll K_{mi}$ et $q_j \ll K_{mj}$, l'analogue du glucose étant injecté à l'état de trace, on peut effectuer une approximation linéaire du modèle. Dans ce cas, les coefficients de transfert sont données par :

$$k_{ij} = V_m / K_m.$$

Les équations décrivant les échanges entre les compartiments sont donc :

$$\frac{dq_1(t)}{dt} = - \left(\sum_{i=2}^3 k_{i1} + k_{01} \right) q_1(t) + \sum_{j=2}^3 k_{1j} q_j(t) + u_1(t)$$

$$\frac{dq_j(t)}{dt} = k_{j1} q_1(t) - k_{1j} q_j(t) \quad j = 2, 3$$

où k_{ij} est le paramètre représentant le coefficient de transfert du traceur du compartiment j au compartiment i ($j \neq i$), q est la quantité de traceur dans le compartiment considéré et $u(t)$ la fonction d'entrée.

Les paramètres sont estimés en supposant que les mesures de radioactivité sont décrites par :

$$z(t_i) = y(t_i) + e(t_i) \quad i = 1, \dots, N$$

où e représente l'erreur de mesure et N le nombre de temps de mesure. L'erreur de mesure est supposée additive, de répartition Gaussienne et de moyenne nulle. La précision de l'estimation des paramètres fournis par le modèle est évaluée par l'étude des résidus. Ils sont calculés à différents temps comme les différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées :

$$res_{ij} = [s(\hat{p}, t_{ij}) - y_{i,j}]$$

où $s(\hat{p}, t_{ij})$ est la valeur prédite par le modèle, $y_{i,j}$ est la valeur mesurée et $\hat{p}$ est le paramètre estimé inconnu. Pour un ajustement acceptable des données, la représentation graphique des résidus doit être aléatoire dans une bande symétrique par rapport à 0, entre -2 et +2 (figure 30).

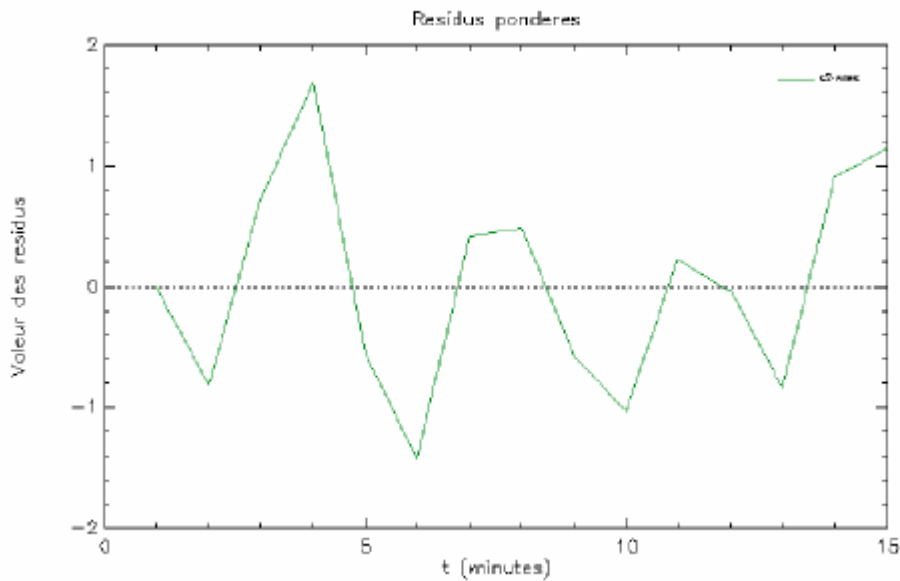


Figure 30 : Exemple de la distribution aléatoire des résidus.

A l'aide des coefficients de transfert d'entrée du traceur dans le cœur, $k(2,1)$, un index d'insulinorésistance cardiaque est calculé. Il correspond au rapport du coefficient d'entrée du traceur dans le compartiment cardiaque mesuré en présence d'insuline sur ce même coefficient mesuré en condition basale.

$$R = \frac{k(2,1)^{insuline}}{k(2,1)^{basal}}$$

Plus l'index est élevé, plus le sujet est sensible à l'insuline. Les coefficients de transfert sont obtenus grâce au module "compartimental" du logiciel SAAM II qui gère le modèle. Le modèle développé grâce au logiciel permet d'obtenir pour chaque coefficient de transfert une estimation moyenne du paramètre, associée à un écart-type, un coefficient de variation (CV) et un intervalle de confiance. Les paramètres estimés, et plus particulièrement le paramètre

d'intérêt $k(2,1)$, sont retenus lorsque les 5 coefficients de transfert du modèle présentent des CV les plus faibles possibles et surtout inférieurs à 100%.

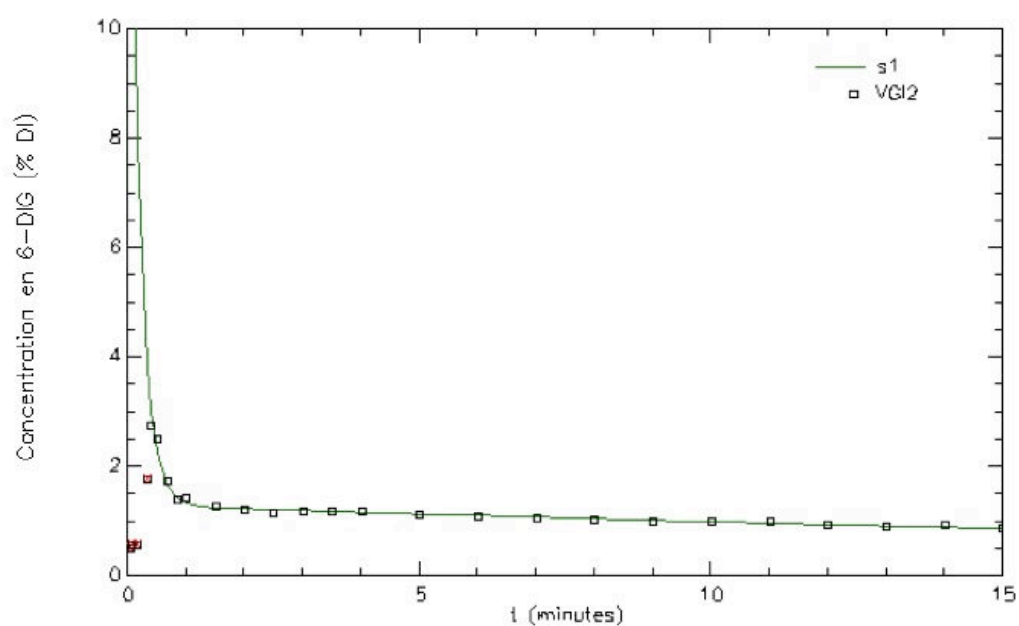


Figure 31 : Cinétique du 6DIG dans le sang (s1) obtenue après ajustement du modèle aux données.

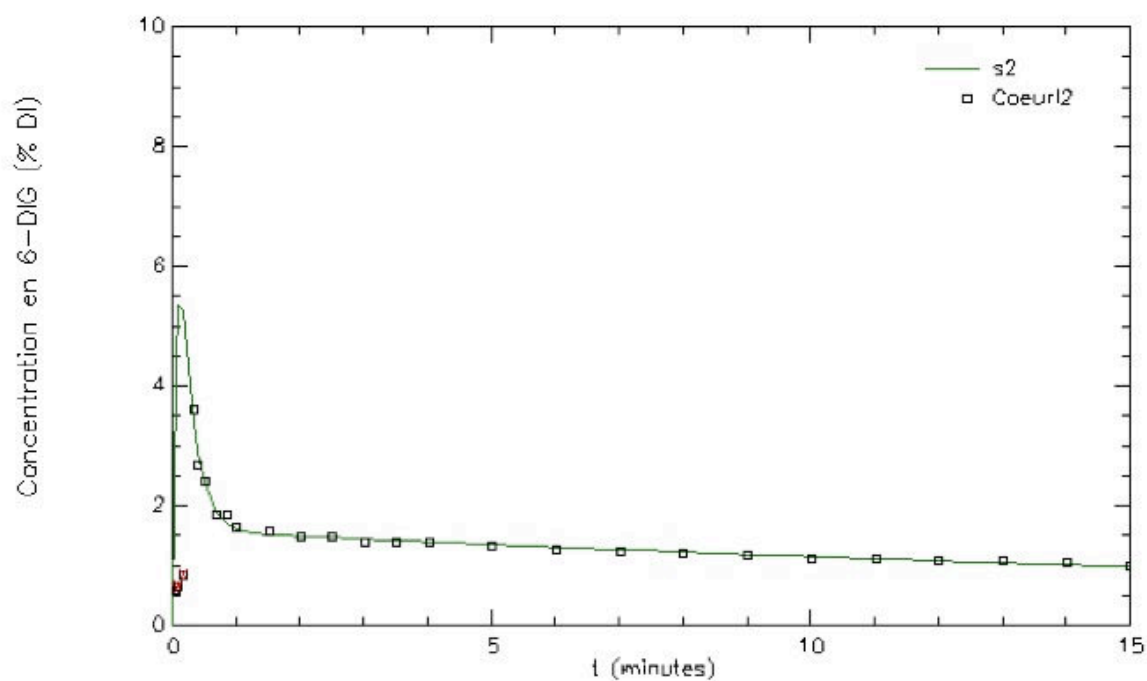


Figure 32 : Cinétique du 6DIG dans le muscle cardiaque (s2) obtenue après ajustement du modèle aux données.

3. Résultats

♦ **Mesure de l'Index IR cardiaque par modélisation mathématique chez les 6 volontaires sains :**

	k(2,1) Basal	k(2,1) Insuline	Index IR Cardiaque
Volontaire 1	2,89	4,93	1,70
Volontaire 2	4,34	3,81	0,88
Volontaire 3	4,98	3,18	0,64
Volontaire 4	4,11	6,39	1,55
Volontaire 5	2,97	5,48	1,84
Volontaire 6	3,82	3,08	0,80
Moyenne	3,85	4,47	1,24
SD	0,81	1,33	0,52

L'analyse de l'insulinorésistance cardiaque avec cette méthode apparaît non optimale car les index IR cardiaque divergeant à moins de 1 chez des patients sains ont mis en évidence des difficultés dans la détermination des courbes des cinétiques cardiaques et d'activités sanguines aux temps courts du 6-DIG par l'analyse des acquisitions dynamiques. En effet le passage du 6-DIG très rapide au niveau des cavités cardiaques et dans l'aorte rend difficile la mise en place des ROI sur la zone anatomique correspondante. De plus l'utilisation des dosages sanguins n'a pas permis chez l'homme d'obtenir une courbe d'activité sanguine du 6-DIG exploitable aux temps courts. En effet, une très grande variabilité des pics d'activité

sanguine a été notée pouvant être expliquée par un manque de prélèvements aux temps courts, non adapté à la rapidité du passage du 6-DIG. Le faible nombre de mesures n'a pas permis de déterminer une courbe d'activité du 6DIG exploitable pour l'utilisation du modèle mathématique pour la mesure de l'index d'insulinorésistance.

4. Discussion

Cette deuxième partie des résultats de mon travail a permis de montrer la faisabilité de l'utilisation du 6-DIG chez l'homme pour mettre en évidence une stimulation du transport du glucose par l'insuline. Pour cette étude, la radioactivité du 6-DIG était toujours mesurée dans le sang et le cœur. Aussi, le modèle mathématique à 3 compartiments développé précédemment a pu être utilisé et transféré à l'homme. Les résultats obtenus en imagerie avec l'aide du modèle ont permis de mettre en évidence une augmentation du transport du 6-DIG du sang vers le cœur en réponse à l'insuline. Cependant les résultats encourageants obtenus chez certains sujets n'ont pas été retrouvés de manière reproductible. Certains volontaires sains présentaient un index d'IR cardiaque proche de 1 alors qu'ils ne devraient pas être porteurs d'une insulinorésistance. L'obtention d'un index d'IR reproductible après différentes mesures réalisées n'a pas été possible en utilisant le modèle mathématique. L'analyse de nos difficultés a permis de mettre en évidence l'importance de la détermination de façon manuelle de la ROI sur le cœur ainsi que sur l'aorte initiale. En effet c'est à partir de la mise en place de cette ROI que, par l'utilisation du logiciel de la gamma caméra General Electric® de type Infinia, les activités « tissulaires » cardiaques et sanguines aux temps courts du 6-DIG ainsi que les courbes des cinétiques du 6-DIG sont déterminées. Pour le modèle mathématique la détermination précise de la courbe d'activité aux temps courts du 6-DIG est primordiale. Cependant la variabilité inter et intra-observateur s'est révélée très importante. Le passage très rapide du 6-DIG au niveau des cavités cardiaques a rendu difficile la mise en place des ROI sur la zone anatomique correspondant au cœur et à l'aorte.

Cette constatation nous a donc amené à chercher une méthode permettant d'identifier les courbes des activités « tissulaires » cardiaques et sanguines aux temps courts du 6-DIG de manière plus reproductible. Cette méthode de mesure fait l'objet de la 3^{ème} partie de mon travail.

En conclusion, nous avons pu montrer la faisabilité de l'utilisation du 6-DIG chez l'homme pour mettre en évidence une stimulation du transport du glucose par l'insuline. Le transfert à l'homme de la méthode de mesure de l'index d'IR cardiaque développée chez l'animal avec le modèle mathématique à 3 compartiments a été possible. Cependant la reproductibilité des résultats n'a pas pu être obtenue à cause d'une variabilité importante de la mesure de l'activité « tissulaire » cardiaque et de l'activité sanguine aux temps courts du 6-DIG.

3^{ème} Partie :

Optimisation du traitement des données

1. Introduction

Le traitement des données acquises en imagerie planaire pour la mesure du transport du glucose dans le myocarde avec le 6-DIG nécessite l'extraction de la cinétique du traceur dans l'organe et le sang. Celle-ci est obtenue en délimitant de façon manuelle une région d'intérêt (ROI) sur le cœur et l'aorte initiale, en se basant sur les images aux temps courts de l'acquisition, grâce au logiciel de la gamma-caméra. Le fait de tracer une ROI manuellement suppose que le compartiment d'intérêt soit bien délimité spatialement des autres compartiments physiologiques. Or dans le cas du 6-DIG, les cinétiques cardiaque et sanguine décroissent très rapidement et le cœur et l'aorte n'apparaissent pas de manière évidente à l'image. Le traitement des données par deux observateurs indépendants a montré une faible reproductivité inter-observateur de la méthode, liée au positionnement de la région d'intérêt. Pour améliorer la détermination des activités « tissulaires » cardiaques et sanguines du 6-DIG aux temps courts nous avons décidé d'utiliser une méthode d'analyse appelée l'analyse factorielle.

Analyse Factorielle

Le principe de l'analyse factorielle en imagerie scintigraphique a été mis au point au début des années 1980 par deux équipes de recherche en France et en Angleterre ([Baber, 1980](#)). C'est une méthode d'imagerie paramétrique qui repose sur la modélisation du signal mesuré en chaque pixel au cours du temps. Dans le cas classique, les séquences d'images suivent l'évolution au cours du temps d'un traceur ou d'un produit de contraste. L'objectif de l'AFSIM (Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales) est de résumer l'information contenue dans la séquence d'images en un petit nombre de courbes, appelées facteurs, qui représentent la cinétique du traceur ou du produit de contraste au sein de structures, représentées par des images, appelées images factorielles.

L'analyse factorielle met en jeu une suite d'équations nombreuses et complexes. Le logiciel Pixies (Physiological Information eXtraction from Image Sequences) ([Apteryx 2004 Pixies: images sequence processing software, version 1.11, http://imagerie.Apteryx.fr/Pixies;](http://imagerie.Apteryx.fr/Pixies) [Laboratoire d'imagerie fonctionnelle, UMR_S 678, F. Frouin](http://imagerie.Apteryx.fr/Pixies)), permet de réaliser des analyses factorielles de façon semi-automatique.

La figure 33 illustre le principe de l'analyse factorielle en séquences d'images dynamiques.

La figure 32 donne un exemple d'analyse factorielle réalisée sur des images dynamiques cardiaques obtenues en PET à l'eau marquée. A partir de la séquence d'images initiale, l'analyse factorielle a estimé 3 composantes : la première correspond au ventricule droit, et la cinétique du traceur est donnée par la courbe associée, le second compartiment correspond au ventricule gauche, dans lequel le traceur arrive un peu plus tardivement puis est évacué, enfin le troisième compartiment correspond au tissu myocardique, dans lequel le traceur s'accumule. Cette représentation trichrome permet d'apprécier le recouvrement partiel des compartiments physiologiques. Ainsi, la séquence d'images originale est résumée par ces 3 images et les 3 courbes associées.

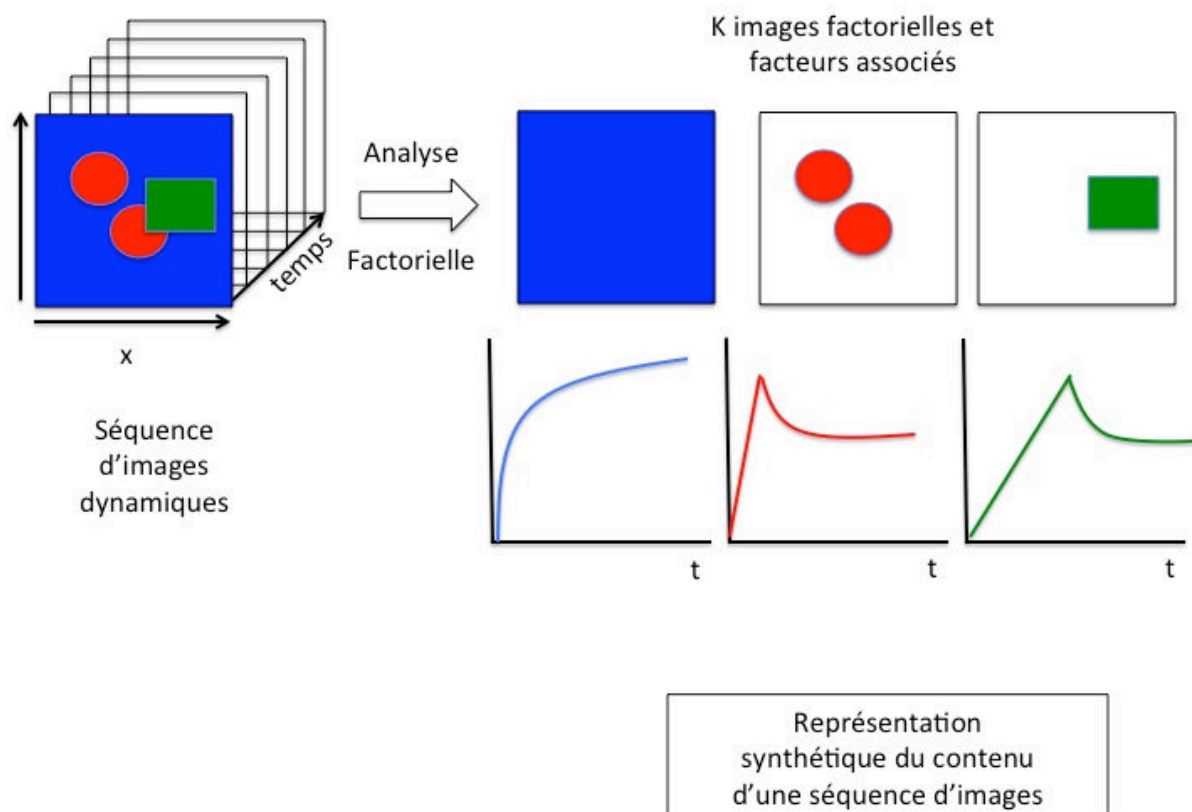


Figure 33 : Principe de l'analyse factorielle de séquences d'images dynamiques.

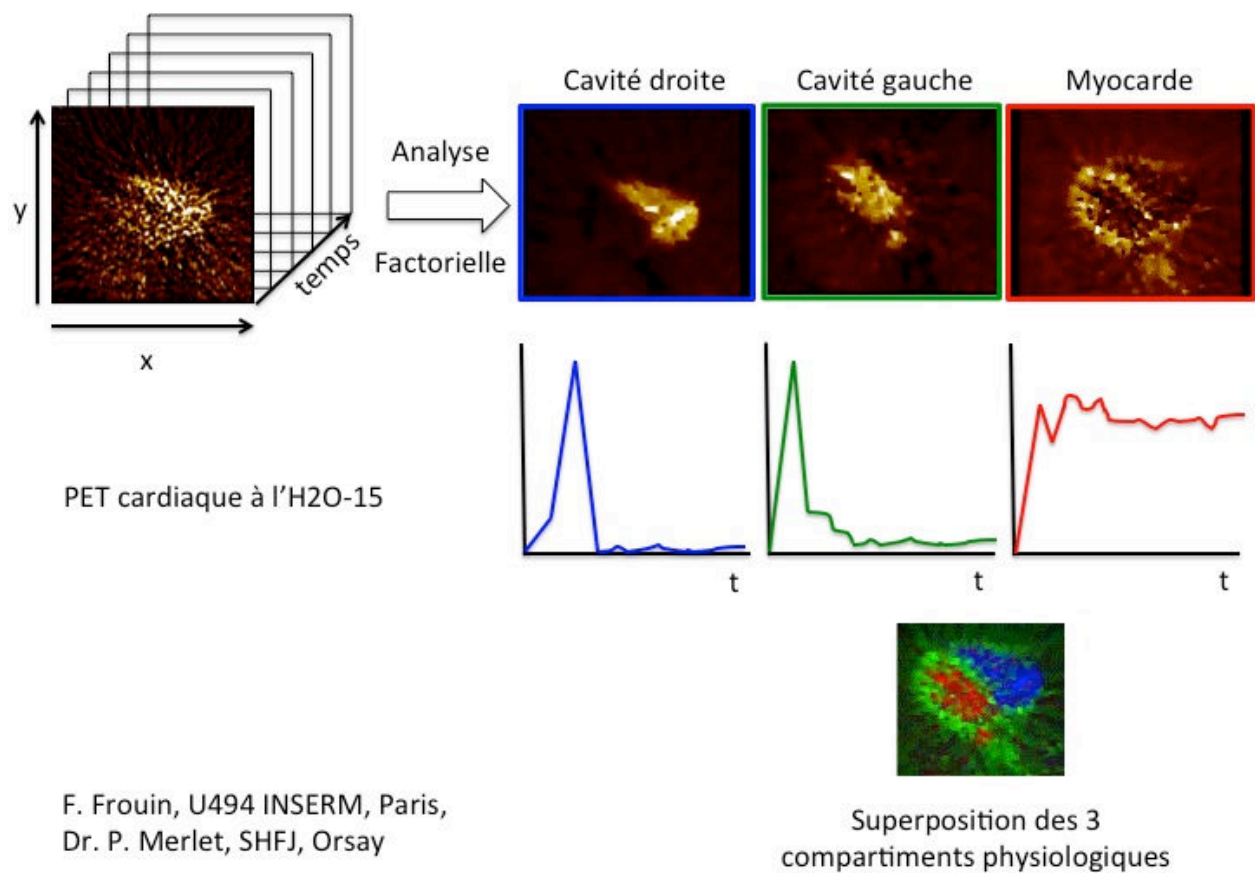


Figure 34 : Analyse factorielle de séquences d'images dynamiques en PET cardiaque à l'H₂O-15 permettant de déterminer les courbes d'activité des cavités cardiaques droite, gauche et du myocarde.

2. Matériel et méthodes

2.1. Protocole expérimental

Les données utilisées pour cette étude sont donc les données acquises en mesure scintigraphique selon une acquisition dynamique chez les sujets ayant participé à la phase 1: sujets sains puis patients diabétiques de type 2.

2.2. Analyse des images

Les séquences d'images obtenues par la γ -camera sont traitées par une analyse factorielle à l'aide du logiciel Pixies. L'échantillonnage temporel des images est de 2 secondes. Une première analyse factorielle permet de localiser la zone d'injection et de masquer ses données parasitant la détermination des activités cardiaque et sanguine. La soustraction de cette série à la série initiale permet d'obtenir une nouvelle série (figure 35).

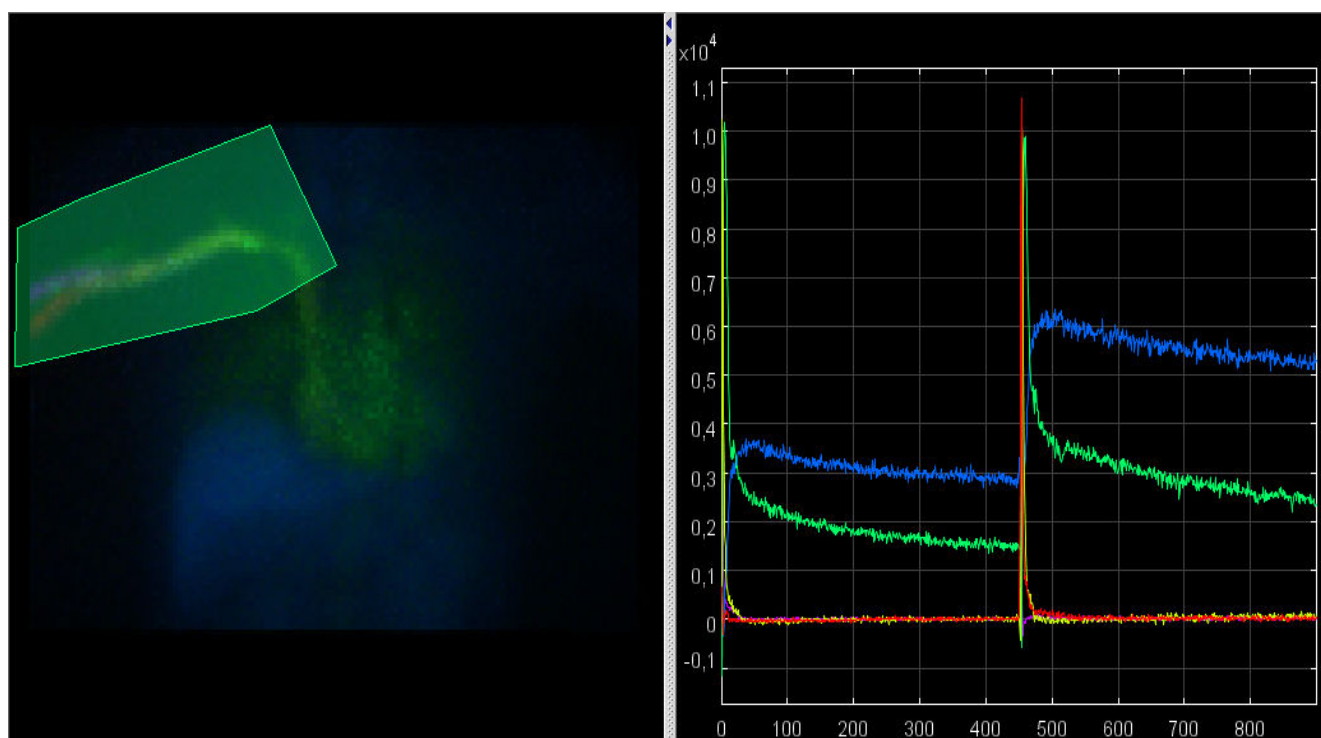


Figure 35: Suppression de la zone d'injection sur les images d'analyse factorielle.

Une seconde analyse factorielle à 5 facteurs est réalisée sur cette nouvelle séquence. Ces images vont servir à la définition d'une région bien ciblée sur le ventricule gauche permettant de déterminer l'activité cardiaque et sur la cavité cardiaque droite permettant de déterminer l'activité sanguine. La figure 36 représente les résultats de cette analyse. Cinq compartiments physiologiques sont identifiés.

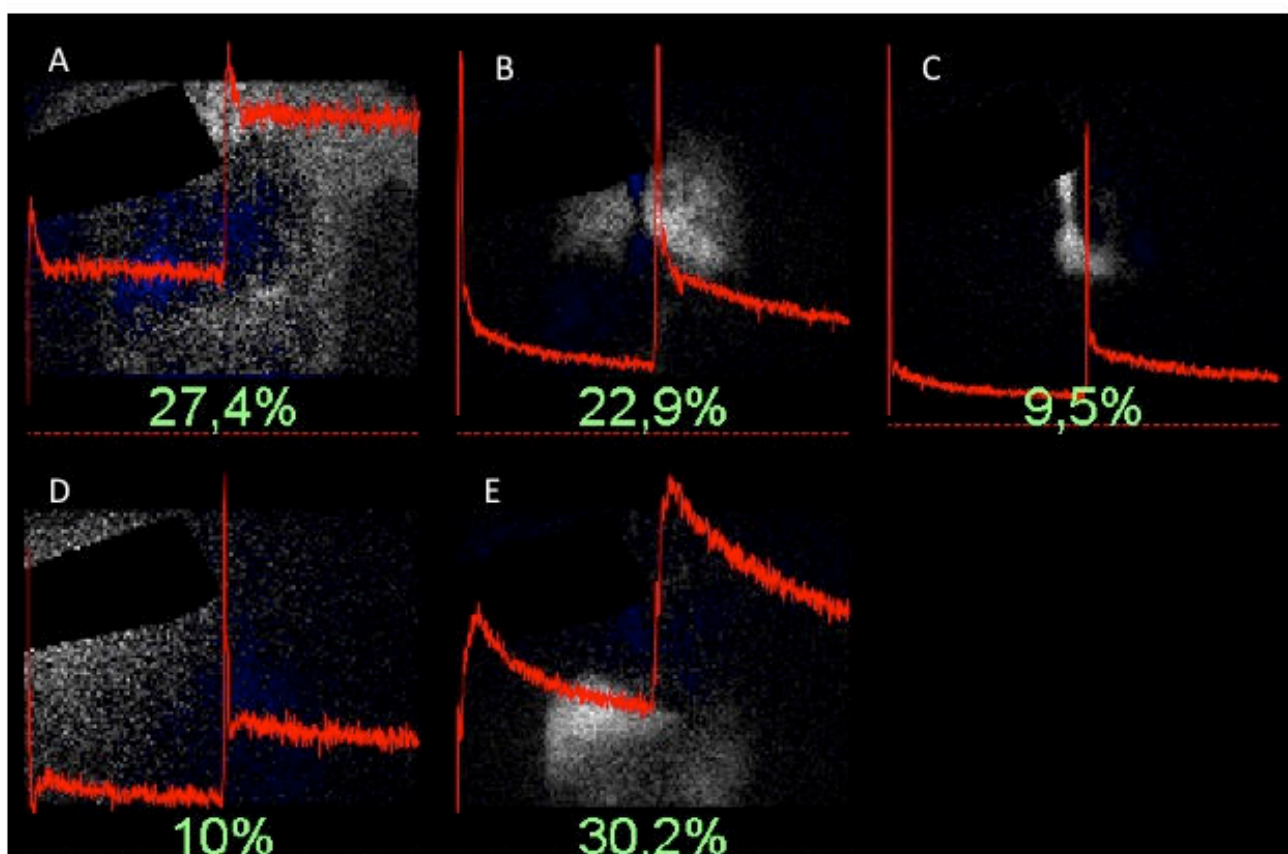


Figure 36: Résultat de l'analyse factorielle à 5 facteurs permettant d'isoler les compartiments physiologiques représentés par le muscle squelettique (A), les poumons et le ventricule gauche (B), la cavité ventriculaire droite (C), un résidu d'injection (D) et le foie (E).

Il est possible de visualiser grâce au logiciel une image en mode multichrome avec l'ensemble des compartiments physiologiques après l'analyse factorielle à 5 facteurs. Les activités mesurées en fonction du temps et du compartiment physiologique sont aussi obtenues par le logiciel (Figure 37).

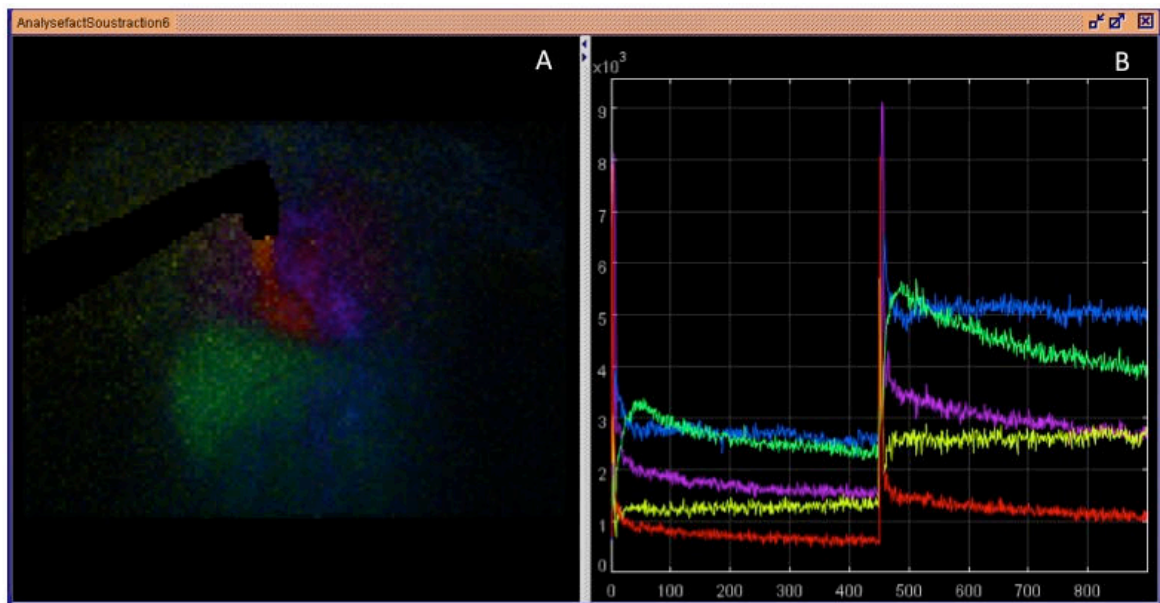


Figure 37 : Analyse factorielle (décomposition en 5 facteurs) présentation multichrome (A) et courbes d'activité mesurées en fonction du temps selon les compartiments (B).

A partir de ces images des seuillages successifs vont permettre de mieux définir et d'extraire les courbes d'activités du VD (figure 38A), du VG (figure 38B) et myocardique du 6-DIG. Cette dernière étant déterminée après avoir réalisé une deuxième analyse factorielle à trois facteurs permettant d'obtenir une visualisation globale du cœur. Un tracé manuel permet de définir une région d'intérêt (ROI) sur le cœur total (figure 39). Une opération de soustraction et d'ajustement visuelle permet d'obtenir la ROI du myocarde. En effet, en retranchant à la ROI du cœur « total » les ROI VD et VG déterminées précédemment par seuillage, on obtient la ROI myocarde comme le montre la figure 40.

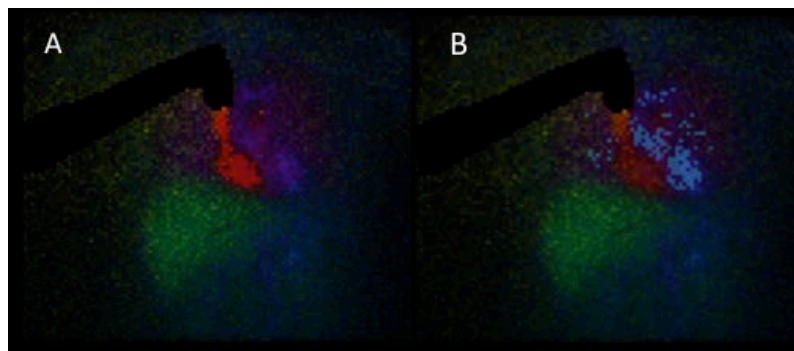


Figure 38 : Analyse factorielle avec méthode de seuillage pour l'extraction des cavités ventriculaires droite (A) et gauche (B).

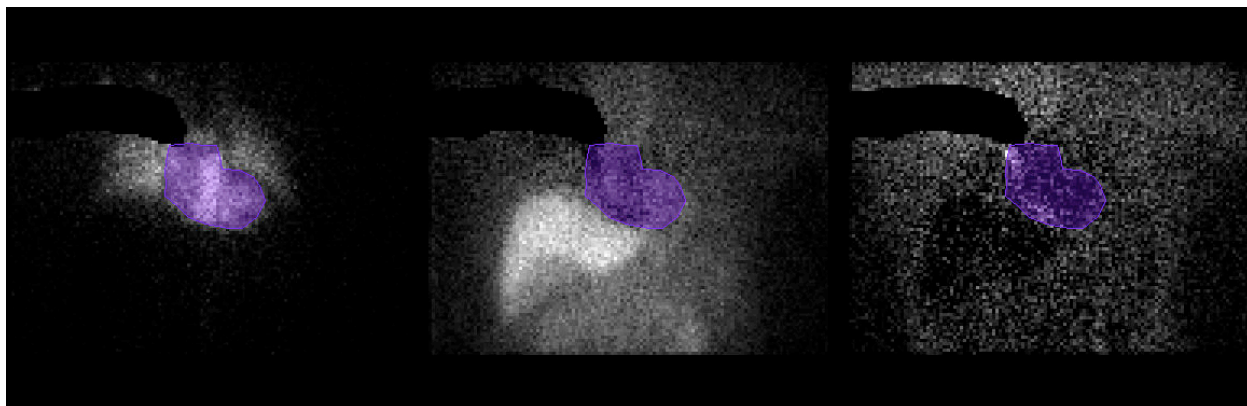


Figure 39 : Analyse factorielle à trois facteurs permettant de délimiter manuellement une ROI cœur « total ».

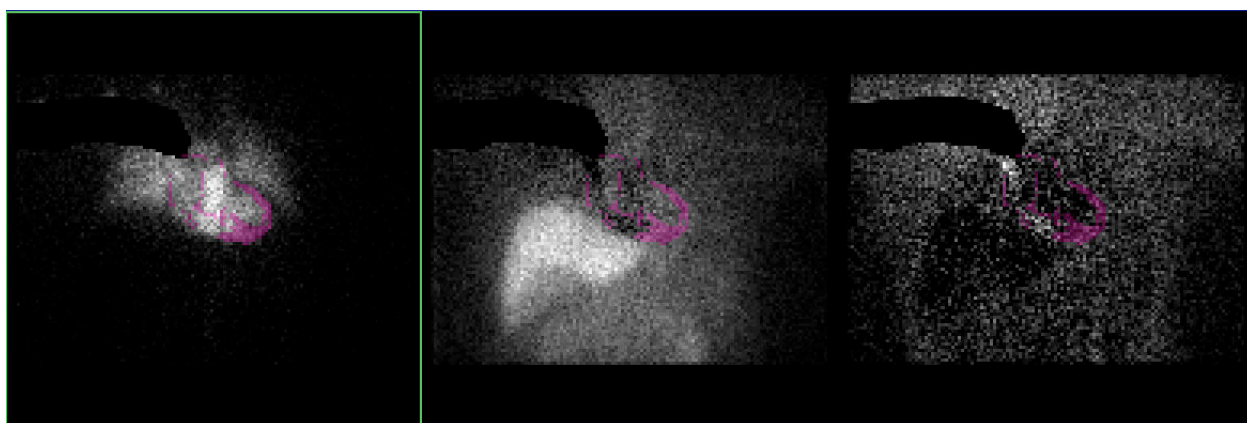


Figure 40 : Détermination de la ROI myocarde en analyse factorielle en retranchant à la ROI du cœur « total » les ROI VD et VG déterminées précédemment par seuillage.

Les courbes d'activité de la cavité ventriculaire droite et myocardique permettent d'obtenir respectivement l'activité sanguine et tissulaire du 6-DIG aux temps précoces.

L'analyse factorielle permet donc l'extraction des courbes d'activité sanguine et d'activité « tissulaire » cardiaque en coups/2 secondes qui seront convertis en coups/ minute puis en

pourcentage de la dose injectée. Les courbes d'activité à l'état basal et sous insuline sont obtenues de façon simultanée.

Les données courbes recueillies sont ensuite analysées à l'aide d'un modèle à compartiments, adapté à la mesure chez l'homme, pour permettre la détermination de l'index cardiaque d'IR.

Ce modèle mathématique de transport du 6DIG est une adaptation du modèle développé chez l'animal. Ce modèle permet de quantifier le transport du traceur à partir des données biologiques obtenues après l'injection du 6DIG *in vivo* chez l'homme, par détection externe de la radioactivité. Il comprend deux compartiments : le compartiment sanguin et le compartiment cœur (myocarde) (Figure 41).

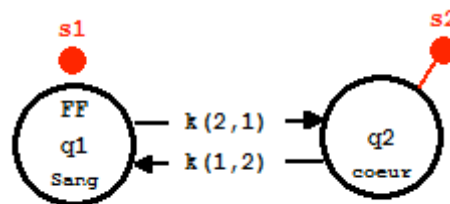


Figure 41 : Modèle mathématique à deux compartiments développé pour l'étude du transport du 6DIG dans le cœur, chez l'homme *in vivo*, par détection externe de la radioactivité.

Ce modèle comporte une fonction d'entrée au niveau du compartiment sanguin ($q1.FF$), il s'agit d'une fonction forcée qui représente l'interpolation linéaire des points expérimentaux mesurés. Ce modèle comporte aussi deux fonctions d'observation, l'une au niveau du compartiment sanguin ($s1$) et la seconde au niveau du compartiment cardiaque ($s2$). Les constantes k représentent les coefficients de transfert entre deux compartiments, $s1=q1$, et $s2=q2$; les échanges entre compartiments sont supposés linéaires. Les coefficients de transfert $k(2,1)$ et $k(1,2)$ représentent respectivement le flux de 6DIG du sang vers le cœur et du cœur vers le sang.

Le transport du glucose à travers la membrane d'un compartiment j à un compartiment i est représenté par les coefficients de transfert k_{ij} . Ces coefficients sont décrits par l'équation :

$$k_{ij} = V_{mi} / (K_{mi} + q_i) \quad \text{et} \quad k_{ji} = V_{mj} / (K_{mj} + q_j)$$

où q_i et q_j sont les quantités de traceur dans les compartiments i et j, K_{mi} et K_{mj} sont les constantes de Michaelis et V_{mi} et V_{mj} les vitesses maximales.

Comme $q_i \ll K_{mi}$ et $q_j \ll K_{mj}$, l'analogue du glucose étant injecté à l'état de trace, on peut effectuer une approximation linéaire du modèle. Dans ce cas, les coefficients de transfert sont donnés par :

$$k_{ij} = V_m / K_m.$$

Les équations décrivant les échanges entre les compartiments sont donc :

$$q_1.FF = \text{lin}(\text{Sang})$$

$$dq_2/dt = k(2,1)*q_1 - k(1,2)*q_2$$

$$dq_1/dt = k(1,2)*q_2 - k(2,1)*q_1$$

Les paramètres sont estimés en supposant que les mesures de radioactivité sont décrites par :

$$z(t_i) = y(t_i) + e(t_i) \quad i = 1, \dots, N$$

où e représente l'erreur de mesure et N le nombre de temps de mesure. L'erreur de mesure est supposée additive, de répartition Gaussienne et de moyenne nulle. La précision de l'estimation des paramètres fournis par le modèle est évaluée par l'étude des résidus. Ils sont calculés à différents temps comme les différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées :

$$res_{ij} = [s(\hat{p}, t_{ij}) - y_{i,j}]$$

où $s(\hat{p}, t_{ij})$ est la valeur prédite par le modèle, $y_{i,j}$ est la valeur mesurée et $\hat{p}$ est le paramètre estimé inconnu. Pour un ajustement acceptable des données, la représentation graphique des

résidus doit être aléatoire dans une bande symétrique par rapport à 0, entre -2 et +2 (figure 42).

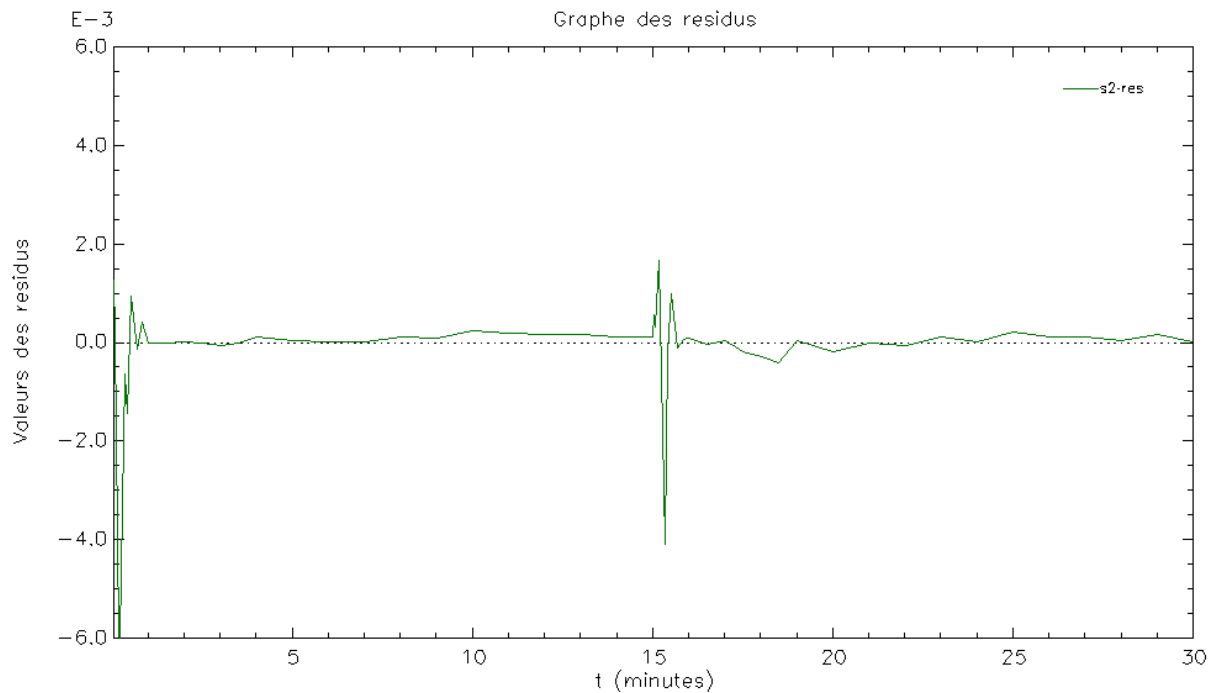


Figure 42 : Exemple de la distribution aléatoire des résidus pour les deux conditions basale (entre 0 et 15 minutes) et insuline (entre 15 et 30 minutes).

A l'aide des coefficients de transfert d'entrée du traceur dans le cœur, $k(2,1)$, un index d'insulinorésistance cardiaque est calculé. Il correspond au rapport du coefficient d'entrée du traceur dans le compartiment cardiaque mesuré en présence d'insuline sur ce même coefficient mesuré en condition basale.

$$R = \frac{k(2,1)^{insuline}}{k(2,1)^{basal}}$$

Plus l'index est élevé, plus le sujet est sensible à l'insuline. Les coefficients de transfert sont obtenus grâce au module "compartimental" du logiciel SAAM II (Simulation, Analysis And Modeling institute, Seattle, WA, 1997) qui gère le modèle. Le modèle développé grâce au

logiciel permet d'obtenir pour chaque coefficient de transfert une estimation moyenne du paramètre, associée à un écart-type, un coefficient de variation (CV) et un intervalle de confiance. Les paramètres estimés, et plus particulièrement le paramètre d'intérêt $k(2,1)$, sont retenus lorsque les 5 coefficients de transfert du modèle présentent des CV les plus faibles possibles et surtout inférieurs à 100%. Les figures 43 et 44 illustrent la cinétique du 6DIG dans le sang et le muscle cardiaque obtenue après ajustement du modèle aux données.

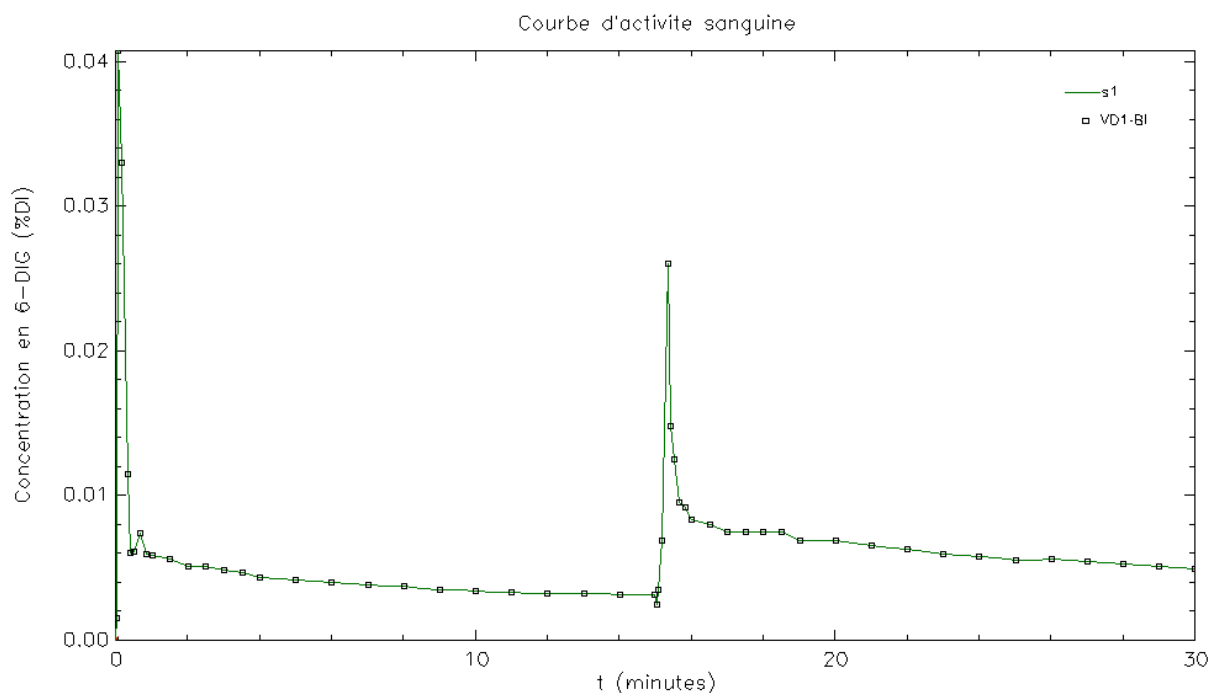


Figure 43 : Cinétique du 6DIG dans le sang (s1).

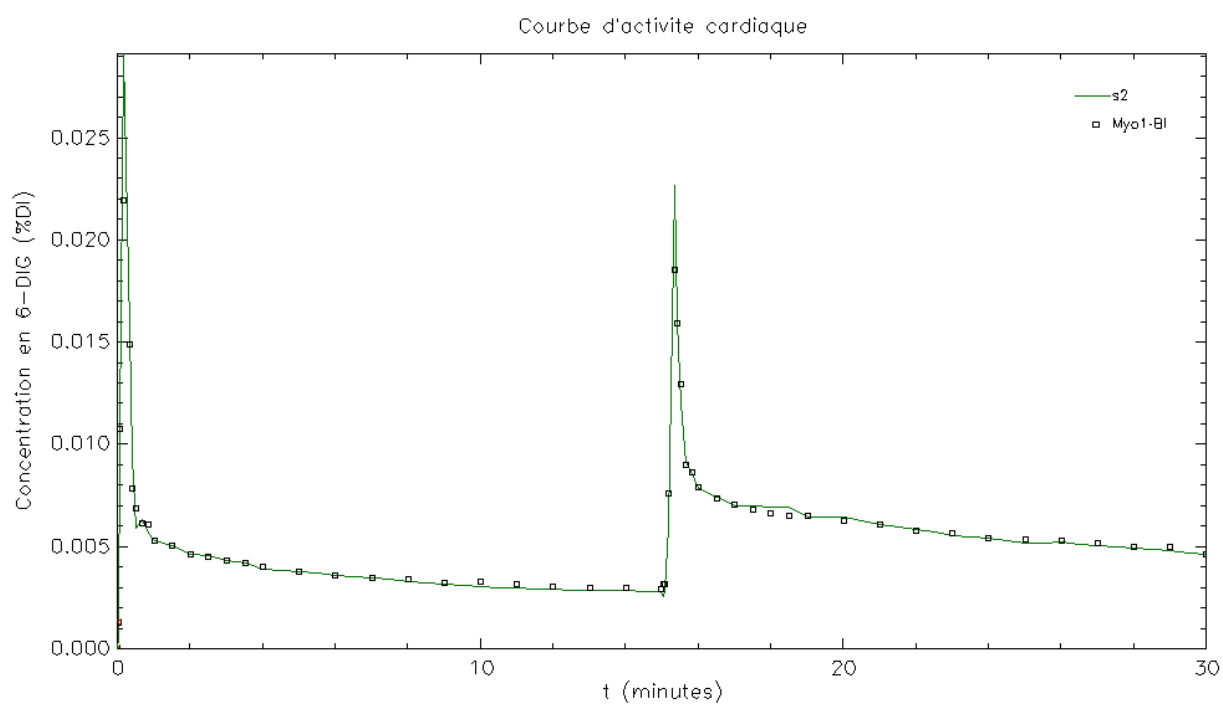


Figure 44 : Cinétique du 6DIG dans le muscle cardiaque (s2) obtenue après ajustement du modèle aux données.

3. Résultats

- Mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque chez les sujets sains en utilisant l'analyse factorielle (évaluation faisabilité et efficacité).

	k(2,1) Basal	k(2,1) Insuline	Index IR Cardiaque
Volontaire 1	18.4	63.2	3.43
Volontaire 2	14.29	31.41	2.20
Volontaire 3	9.32	13.39	1.43
Volontaire 4	36.5	91.74	2.51
Volontaire 5	4.34	9.57	2.20
Volontaire 6	40.75	69.47	1.70
Moyenne	20.6	46,46	2,24
SD	14.8	33.3	0.7

- **Mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque chez les sujets diabétiques de type 2 en utilisant l'analyse factorielle (évaluation faisabilité et efficacité).**

	k(2,1)Basal	k(2,1)Insuline	Index IR Cardiaque
Diabétique_1	14.3	17.7	1,23
Diabétique_2	9.9	12	1,21
Diabétique_3	13.2	30	2.3
Diabétique_4	44.9	53	1,18
Diabétique_5	34.3	26.3	0.77
Diabétique_6	9.25	11.95	1,29
Moyenne	20.98	25.16	1,54
SD	14,9	15.5	1.08

- **Etude de la reproductibilité et de la sensibilité de la mesure de l'index d'insulinorésistance cardiaque.**

L'injection d'insuline entraîne bien une augmentation du paramètre k (2,1) avec une différence entre k (2,1) basal et k (2,1) insuline significative chez les volontaires sains ($p = 0.031$), test de Wilcoxon. L'effet de l'insuline sur les paramètres k (2,1) montre une différence non significative chez les sujets diabétiques ($p = 0.22$).

L'index d'IR cardiaque est statistiquement plus important chez les volontaires sains par rapport aux sujets diabétiques ($p = 0.026$), test de Mann-Whitney.

La reproductibilité de la méthode a été évaluée par l'analyse du paramètre k (2,1) obtenu dans

les conditions basales, mesuré chez les patients sains à 1 semaine d'intervalle avec un Test de Wilcoxon. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs estimées lors de la première visite et les valeurs estimées lors de la seconde visite ($p = 0.75$).

	k(2,1) basal 1 ^{ère} venue	k(2,1) basal 2 ^e venue
Volontaire_1	18.65	18.4
Volontaire_2	21.7	14.29
Volontaire_3	6.9	9.32

4. Discussion

L'utilisation de l'analyse factorielle a donc permis d'améliorer la faisabilité et la reproductibilité de la mesure de l'index cardiaque d'insulinorésistance tant chez les sujets sains que les sujets diabétiques de type 2. L'analyse factorielle a permis, en analysant les séquences dynamiques scintigraphiques, de déterminer les courbes d'activité sanguine et « tissulaire » cardiaque du 6-DIG aux temps précoces et de déterminer l'index d'IR cardiaque par modélisation mathématique.

Ainsi une différence significative d'index d'insulinorésistance a été mise en évidence entre les sujets diabétiques de type 2 et les sujets sains.

Ces résultats des plus intéressants devront être confirmés lors de la phase 2 qui s'attachera à comparer et étudier les corrélations entre les valeurs d'insulinorésistance obtenues par la méthode scintigraphique et le clamp euglycémique hyperinsulinémique, méthode de référence pour la mesure de l'insulinorésistance.

Discussion générale

L'étude clinique de phase 1 a permis de montrer l'innocuité du 6-DIG et de la méthode de mesure de l'IR. Les premiers résultats sur la faisabilité, la reproductibilité et l'efficacité de la mesure de l'IR cardiaque sont encourageants avec notamment l'apport de l'analyse factorielle des images dynamiques scintigraphiques. Les données dosimétriques quant à elles montrent que la dose absorbée par le patient pour une exploration complète est de 3 à 4 mSv. La dosimétrie est relativement basse mais reste élevée pour le développement de ce test de mesure de l'IR dans une perspective du dépistage de masse. Il pourrait être par contre des plus intéressants pour l'évaluation plus précise du risque cardiovasculaire et métabolique dans une population déjà identifiée comme à risque.

Le diabète de type 2, dont l'incidence est en constante augmentation dans le monde ([Wild, 2004](#)), constitue un véritable problème de santé publique. Il en est de même pour le syndrome métabolique ([Hossain, 2007](#)). Plus important la plupart des patients atteints d'un diabète de type 2 présentent un syndrome métabolique avant l'apparition des premiers signes cliniques du diabète ([Sattar, 2008](#)). Ainsi, le dépistage précoce de la résistance à l'insuline, qui constitue à ce jour le meilleur facteur prédictif du développement du diabète de type 2, est d'un intérêt majeur.

Dans le cœur, l'IR met en jeu un défaut de signalisation à l'insuline, une altération du transport du glucose et du stockage du glycogène dans les cardiomyocytes. Le maintien des concentrations intracellulaires en ATP dans le muscle cardiaque est nécessaire au maintien de l'intégrité de la fonction cardiaque. En condition physiologique, la production d'ATP résulte pour 60 % à 80 % de l'oxydation des lipides, pour 20 % du glucose et 10 % du lactate. En situation de « stress » myocardique le glucose devient la voie préférentielle permettant de fournir un meilleur rendement énergétique. Comme dans le muscle squelettique, le transport du glucose est assuré principalement par les transporteurs GLUT1 et GLUT4. L'insuline joue aussi un rôle important via son récepteur. Après fixation sur son récepteur, une cascade de phosphorylations conduit à la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique des

cardiomyocytes et permet ainsi l'augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule. De nombreuses protéines sont impliquées dans cette cascade de phosphorylations. Bien que le mécanisme de l'IR tissulaire et notamment cardiaque ne soit pas parfaitement connu car multifactoriel, l'altération du métabolisme glucidique dans le cœur résulterait précocement d'un défaut en GLUT4 et de sa translocation ([Wright, 2009](#)). Le rôle de l'excès d'acides gras semble important et cela permet intuitivement de mieux comprendre le rôle majeur du surpoids et de l'obésité dans le développement du syndrome métabolique et du diabète de type 2 mis en évidence de longue date ([Reaven, 1995](#)). On rappelle que ce rôle néfaste des acides gras a été montré dans des modèles animaux où l'importance de l'IR cardiaque a été souligné car plus précoce. Ainsi chez des souris nourries avec un régime riche en lipides, l'IR cardiaque apparaît 10 jours après le début du régime alors que l'IR dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie est détectée au bout de 3 semaines de régime. Après 20 semaines de régime, les animaux développent des anomalies cardiaques qui semblent découler de l'IR ([Park, 2005](#)). Par ailleurs, l'élévation de la concentration en AGL plasmatiques entraîne aussi chez l'homme une réduction du transport du glucose dans le cœur ([Randle, 1963](#)). En effet le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline sont souvent associés à une élévation du taux d'AGL plasmatique ([Reaven, 1988](#)) Une élévation de la concentration en AGL entraîne en effet une insulino-résistance sévère chez les sujets sains ([Roden, 1996](#)) et certaines études avancent le fait que le cycle de Randle opérant dans le muscle squelettique et dans le cœur serait le mécanisme conduisant à l'insulino-résistance de ces organes ([Nuutila, 1992](#)). Cependant, des mécanismes plus complexes d'inhibition du transport du glucose en présence d'insuline ne sont pas à exclure. Dans le diabète de type 2, le muscle squelettique est essentiellement mis en cause puisqu'à lui seul, il est responsable de la captation de la majorité du glucose lorsque son transport est stimulé par l'insuline. Cependant, plusieurs études ont montré que le cœur, présente lui aussi une résistance à l'insuline ([Voipio-Pulkki, 1993](#) ; [Paternostro, 1996](#) ; [Botker, 1997](#) ; [Yokoyama, 2000](#)). La plupart montre que l'utilisation

régionale du glucose (cœur et muscle squelettique) était également corrélée avec la sensibilité à l'insuline globale de l'organisme. Globalement, si l'insulino-résistance de l'organisme et le défaut de transport du glucose observé au niveau du muscle squelettique sont des caractéristiques du diabète de type 2, il apparaît que l'insulino-résistance cardiaque y est également associée (Iozzo, 2002). L'IR myocardique est proportionnel à la sensibilité globale de l'organisme à l'insuline et à celle du muscle squelettique, indépendamment de la présence de pathologies coronaires et du débit sanguin. Le cœur peut donc constituer une cible potentielle pour le dépistage précoce de cette pathologie.

La technique en cours de mise au point ici présente plusieurs avantages pour une application à large échelle dans le domaine de l'évaluation du risque métabolique et cardiovasculaire. En effet une acquisition de seulement 30 minutes permet la mesure de l'IR cardiaque. L'utilisation de l'iode 123 et de camera SPECT permettra une large diffusion de la technique. Aux USA, cardiologues et diabétologues pourraient se munir d'une camera dédiée pour une mesure en cabinet. Ainsi l'obtention d'un index chiffré reproductible applicable en pratique clinique permettrait le développement de plusieurs axes de recherche importants.

Nous pouvons les identifier au nombre de trois.

Le premier serait la meilleure évaluation du risque métabolique et cardiovasculaire des patients. Notre technique pourrait en effet permettre une meilleure évaluation du risque métabolique du passage au stade diabétique d'une population à risque qui pourrait être la population « obèses » ainsi que les patients cumulant les composantes du syndrome métabolique. La mesure de l'insulino-résistance, précédant de plusieurs années l'apparition d'un vrai diabète, permettrait l'évaluation et le développement de mesures préventives médicamenteuses. Une amélioration de l'évaluation du risque cardiovasculaire chez les patients diabétiques de type 2 est aussi nécessaire. Les recommandations, pour les diabétiques, préconisent des cibles thérapeutiques pressionnelles (Mancia, 2007) et métaboliques (Rydén, 2007) qui sont parfois difficiles à atteindre sans l'utilisation de

multiples molécules et de stratégies agressives. Ainsi une tension artérielle inférieure à 130/80 et un taux de HbA1C% de moins de 6,5% constituent les cibles à obtenir. Cependant, plusieurs études ne montrent pas de bénéfice de ces stratégies agressives pour diminuer les complications macro-vasculaires (Patel, 2008 - Duckworth, 2009) et même pourraient augmenter la mortalité (Gerstein HC, 2008). Ces éléments montrent toutes les difficultés à bien évaluer et à prendre en charge le risque cardiovasculaire des patients diabétiques. Le développement de marqueurs de risque intermédiaire permettant de mieux évaluer cette population est donc important. Ainsi la mesure de l'index d'IR cardiaque pourrait être utile dans cette évaluation des patients diabétiques.

L'application de notre méthode dans le domaine de l'insuffisance cardiaque et de la cardioprotection constituerait le dernier axe de recherche, des liens forts existant entre l'insuffisance cardiaque et l'IR (Witteles, 2008). L'apport d'une mesure de l'IR applicable en pratique clinique pourrait développer une nouvelle voie de dépistage précoce des cardiomyopathies diabétiques ou non diabétiques et aussi valider des nouvelles stratégies thérapeutiques.

Limites : Notre technique doit être validée face à une technique reconnue de mesure de l'insulinorésistance. Ceci sera l'objet de la prochaine étape de développement de la méthode. En effet lors d'une phase II, nous allons comparer au clamp euglycémique hyperinsulinique les résultats obtenus par mesure scintigraphique. Cette étude sera primordiale pour la validation de notre méthode en étudiant les corrélations existantes entre l'index d'IR cardiaque et la sensibilité à l'insuline générale. Encore plus important sera, si la technique est validée, l'évaluation de son apport dans la prise en charge du risque métabolique et cardiovasculaire des patients.

Conclusion : La recherche translationnelle sur le 6-DIG, radiopharmaceutique traceur du transport du glucose, se poursuit avec un succès du passage à l'homme de la molécule. Les méthodes de mesure de l'IR cardiaque développées chez l'animal ont aussi pu être

transposées chez l'homme notamment grâce à l'apport de l'analyse factorielle. Cette nouvelle méthode simple, rapide et reproductible offre le développement d'axes de recherche clinique importants dans un futur proche.

Perspectives : protocole de Phase II

1. PHASE II

Comparaison d'une nouvelle technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec la technique de référence : utilisation du 6-DIG comme marqueur du transport du glucose.

GLUCIMAG-2

CONFIDENTIEL

Promoteur :

Inserm – Institut thématique de Santé Publique - Pôle Recherche Clinique (PRC)
101, rue de Tolbiac, 75654 Paris Cedex 13

Investigateur coordonnateur :	Responsables clinique et scientifique :	
Dr Gilles Barone-Rochette	Clinique :	Scientifique :
Fonction : PHU	Dr Alex Calizzano : PH Pr Daniel Fagret : PU-PH	Pr Catherine Ghezzi : PU Dr Pascale Perret : CR1
<i>Adresse : Consultations et Explorations Fonctionnelles Cardiologie, RCH, Hôpital Michallon, CHU de Grenoble</i>	Adresse : Service de biophysique et médecine nucléaire, Hôpital Michallon, BP 217, 38043 GRENOBLE CEDEX 9	Adresse : UMR-SU1039 Domaine de la merci, 38700, La TRONCHE
Tel : 04-76-76-84-80	Tel : 04-76-76-56-32	Tel : 04 76 63 71 02
Email : GBarone@chu-grenoble.fr	Email : ACalizzano@chu-grenoble.fr	Email : catherine.ghezzi@ujf-grenoble.fr
	Email : DFagret@chu-grenoble.fr	Email : pascale.perret@ujf-grenoble.fr

Nous avons donc montré la faisabilité de l'utilisation du 6-DIG chez l'homme, pour mettre en évidence une stimulation du transport du glucose par l'insuline. La méthode de mesure en imagerie mise au point chez l'animal (analyse multicompartimentale) a pu être utilisée, transférée et améliorée pour une application chez l'homme. L'utilisation de l'analyse factorielle a permis d'améliorer la faisabilité, la reproductibilité et l'efficacité de la mesure de cet IR cardiaque tant chez les sujets sains que les sujets diabétiques de type 2.

Ainsi nous avons pu déterminer avec le 6-DIG un index d'insulinorésistance nous permettant de discriminer une population résistante d'une population sensible à l'insuline.

Ces résultats des plus intéressants devront être confirmés lors de la phase 2 qui s'attachera à comparer et étudier les corrélations entre la mesure de l'insulinorésistance par notre méthode et le clamp euglycémique hyperinsulinique, méthode de référence actuellement.

Désormais nous souhaitons poursuivre le développement de cette nouvelle méthode de mesure de l'insulinorésistance par imagerie au cours d'une étude de phase II. Cette phase aura pour but de valider la méthode de mesure en le comparant à l'examen de référence : le clamp euglycémique hyperinsulinique. Elle sera primordiale pour la validation de notre méthode en étudiant les corrélations existantes entre l'index d'IR cardiaque et la sensibilité à l'insuline générale.

2. OBJECTIFS

2.1 *Objectif principal*

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'accord (agreement) de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG par rapport à la technique de référence : le clamp euglycémique hyperinsulinique.

2.2 *Objectifs secondaires*

Objectif 2 :

Evaluer la faisabilité de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez des sujets présentant ou non une insulinorésistance.

Objectif 3 :

Evaluer la tolérance et le confort des sujets insulinosensibles et des sujets insulinorésistants vis-à-vis de la technique.

Objectif 4 :

Evaluer la reproductibilité inter et intra opérateur.

Objectif 5 :

Analyser les anomalies structurelles et fonctionnelles cardiaques liées au désordre métabolique de l'insulinorésistance.

3. TYPOLOGIE DE L'ESSAI ET PLAN EXPERIMENTAL

3.1 Type d'essai

Mise au point d'une technique diagnostique innovante vs technique de référence, assimilée à une phase IIa.

Il s'agit d'une investigation à visée diagnostique

3.2 Exposé du plan expérimental

Il s'agit d'une étude monocentrique, non randomisée, contrôlée, chez 20 sujets.

Chaque sujet bénéficiera de 3 visites au moins : une visite d'inclusion, une visite au cours de laquelle sera réalisée la scintigraphie au 6-DIG et une visite de fin d'étude.

Une quatrième visite pourra être programmée, si le volontaire l'accepte, pour réaliser la technique du clamp euglycémique hyperinsulinique.

3.3 Calendrier prévisionnel de l'essai (Flow-Chart)

- Durée de l'étude par sujet : 17 jours
- Durée d'inclusion : 1 an
- Date prévue pour le début des inclusions : Septembre 2013
- Date prévue pour la fin des inclusions : Septembre 2014
- Durée totale de l'étude : 1,5 an
- Date prévue pour la fin de l'étude : octobre 2014-mars 2015

4. Sélection des personnes

4.1 **Populations étudiées**

Les personnes recrutées pour l'étude devront répondre à l'ensemble des critères d'inclusion sans présenter de critères de non-inclusion ou d'exclusion.

Les sujets seront inclus dans l'étude pour une durée de 17 jours.

Vingt sujets seront inclus.

4.2 **Recrutement**

4.2.1 **Critères d'inclusion**

Vingt patients avec des degrés variable d'insulinoresistance allant d'un statut d'insulinosensibilité à celui d'insulinorésistance, un overlap des mesures entre les deux groupes nous permettra de disposer d'une grande gamme d'index t d'insulinoresistance (10 patients avec $\text{HOMA-IR} < 2.5$ and 10 avec $\text{HOMA-IR} > 2.5$) seront inclus ([Matthews DR, 1985](#)). Chaque sujet bénéficiera d'un clamp euglycémique hyperinsulinique et d'une mesure par scintigraphie.

Critères communs

- Age compris entre 18 et 65 ans
- Pour les femmes non ménopausées depuis au moins 1 an ou non stérilisée chirurgicalement : contraception en cours, hormonale ou physique, à l'exception des méthodes locales (spermicide, diaphragme, cape et préservatif)
- Personne affiliée à la sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime
- Ayant donné leur consentement écrit

Les critères suivants permettront de définir un phénotype de patients plutôt insulinosensibles :

- $\text{HOMA} < 2.5$
- Indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 25
- Tour de taille < 94 cm chez l'homme et < 80 cm chez la femme
- $\text{HDL} > 1,03$ mmol/L chez l'homme, $> 1,29$ mmol/L chez la femme
- Triglycérides $\leq 1,69$ mmol/ L chez l'homme ou la femme

Les critères suivants permettront de définir un phénotype de patients plutôt insulinorésistants :

- HOMA ≥ 2.5
- IMC ≥ 25
- Tour de taille ≥ 94 cm pour les hommes et ≥ 80 cm pour les femmes
- HDL $\leq 1,03$ mmol/L et $\leq 1,29$ mmol/L chez la femme
- Triglycérides $> 1,69$ mmol/ L chez l'homme ou la femme

4.2.2 Critères de non-inclusion

- Cardiomyopathie instable (sur avis de cardiologues experts)
- Hypertension artérielle sévère non équilibrée définie par Pression artérielle systolique (PAS) ≥ 180 mmHg et/ou Pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 110 mmHg
- Antécédent d'accident vasculaire cérébral
- Antécédent d'épilepsie
- Antécédent de traumatisme crânien
- Antécédent de chirurgie hypophysaire par voie haute
- Pathologie psychiatrique nécessitant un traitement chronique
- Traitement en cours par insuline
- Traitement en cours pouvant interférer avec le métabolisme du glucose et en particulier : metformine, traitement chronique par inhibiteur de la monoamine oxydase (IMAO), corticoïdes par voie générale et locale, diurétiques thiazidiques, Bêta bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, danazol, chlorpromazine, Bêta2 stimulants par voie générale et locale
- Antécédents de pathologie pouvant altérer les capacités d'absorption, de diffusion et d'excrétion du radiopharmaceutique : maladie de Crohn, maladie cœliaque, insuffisance rénale définie par une clairance de la créatinine < 60 ml/mn, insuffisance hépatique
- Allergie connue à l'un des constituants du produit
- Intoxication volontaire éthylique ou aux stupéfiants
- Régime hypocalorique restrictif, végétarien
- Participation à une autre recherche biomédicale dans le même temps ou période d'exclusion en cours d'une autre recherche biomédicale
- Femme enceinte, parturiente, mère qui allaite
- Personne privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, personne faisant l'objet d'une mesure de protection légale
- Conditions de vie laissant présager de l'incapacité à suivre l'ensemble des visites prévues par le protocole

4.2.3 Description du mode de recrutement

Les sujets seront recrutés à partir du fichier de volontaires du Centre d'Investigation Clinique (CIC) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble et par annonce dans la presse écrite et radiophonique locale. Une pré-sélection téléphonique sera mise en œuvre par le CIC.

5. Critères d'évaluation

5.1 Paramètres étudiés ou critères d'efficacité

5.1.1 Définition des paramètres étudiés ou critères d'évaluation (principaux et secondaires) de l'efficacité et technique(s) de mesure

Critère de jugement principal :

Coefficient de corrélation entre les deux techniques de mesure de l'insulinorésistance : clamp hyperinsulinique euglycémique et scintigraphie au 6-DIG.

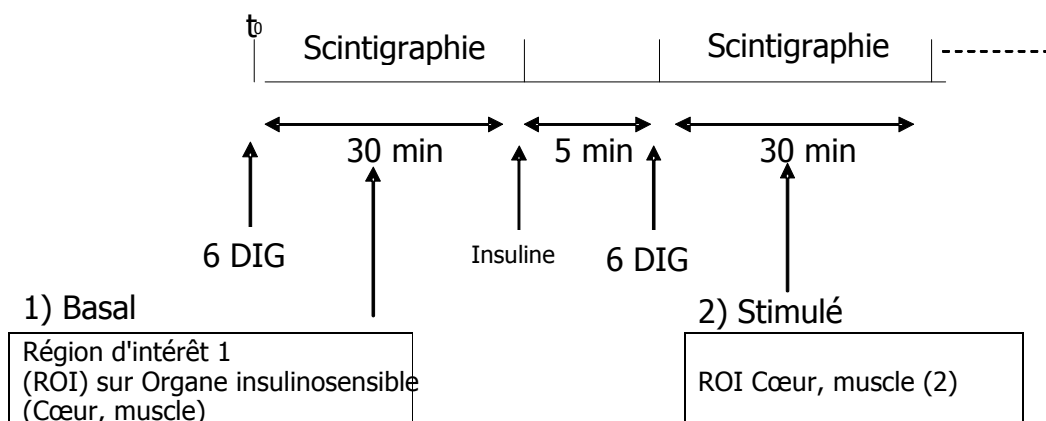
La scintigraphie au 6-DIG permet d'établir un indice d'insulinorésistance IR. Le clamp euglycémique hyperinsulinique donne un SI (Indice de sensibilité à l'insuline) et un GIR (Glucose Infusion rate).

5.1.2 Méthodes et calendriers prévus pour mesurer, recueillir, analyser les paramètres étudiés (critères d'efficacité ou autres)

5.1.2.1 Scintigraphie au 6-DIG.

- Protocole expérimental

Les données utilisées pour cette étude sont les données acquises en mesure scintigraphique selon une acquisition dynamique chez les sujets pendant une phase basale puis stimulée (sous insuline). L'analyse du signal en imagerie s'intéresse au cœur mais aussi au muscle squelettique périphérique en utilisant l'analyse factorielle (Benali H, 1994). Elle nous permettra donc d'isoler le compartiment sanguin, celui du muscle cardiaque et le muscle squelettique.



Analyse des images

Les séquences d'images obtenues par la γ -camera seront traitées par une analyse factorielle à l'aide du logiciel Pixies. L'analyse factorielle permet d'identifier plusieurs compartiments physiologiques (le muscle squelettique, les poumons, le ventricule gauche et droit, un résidu d'injection et le foie). Le résidu de l'injection correspond à l'activité de 6-DIG présente dans les premières secondes entre le point d'injection et la route vasculaire que le traceur emprunte (l'activité très importante dans les pixels concernés lors de l'analyse factorielle à 5 compartiments le faisant ressortir). A partir de ces images des seuillages successifs vont permettre de mieux définir et d'extraire les courbes d'activités sanguines (défini par le contenu de la cavité du ventricule droit), du myocarde et du muscle squelettique du 6-DIG. Une opération de soustraction et d'ajustement visuel permet d'obtenir la région d'intérêt (ROI) du myocarde tandis que celle du muscle squelettique est déterminée après avoir tracé manuellement une ROI sur le muscle deltoïde au niveau de l'épaule gauche.

. L'analyse factorielle permet donc l'extraction des courbes d'activité sanguine, d'activité « tissulaire » cardiaque et d'activité musculaire en coups/2 secondes qui seront convertis en coups/ minute puis en pourcentage de la dose injectée.

Les données courbes recueillies sont ensuite analysées à l'aide de deux modélisations mathématiques multicompartimentales, l'une dédiée au muscle cardiaque et l'autre au muscle squelettique. Pour obtenir les index d'insulino-résistance, nous utilisons ces modèles développés à l'aide du module "compartimental" du logiciel SAAM II (Simulation, Analysis And Modeling institute, Seattle, WA, 1997). A l'aide des coefficients de transfert d'entrée du traceur dans le cœur et le muscle squelettique, $k(2,1)$, un index d'insulino-résistance est calculé. Il correspond au rapport du coefficient d'entrée du traceur dans le compartiment musculaire ou cardiaque mesuré en présence d'insuline sur ce même coefficient mesuré en condition basale.

$$R = \frac{k(2,1)^{insuline}}{k(2,1)^{basal}}$$

5.1.2.2 - Technique du clamp euglycémique hyperinsulinique.

Il s'agit de la méthode de référence pour l'étude de la sensibilité à l'insuline. Cette méthode a été développée par De Fronzo en 1977 ([DeFronzo RA, 1979](#)).

La durée totale de ce test est de 3h30 : 30 minutes de repos avant l'épreuve pour la baseline, 2h de perfusion d'insuline à palier constant et une heure d'observation après l'épreuve avant de laisser repartir le sujet.

- Equipement du sujet :

L'insuline et le glucose sont perfusés par le même cathéter posé au niveau de la veine antécubitale. L'avant-bras sera réchauffé en utilisant un coussin chauffant.

Un second cathéter inséré dans une veine de l'avant-bras controlatérale, va permettre de recueillir les échantillons sanguins pendant toute la durée du test.

- Procédure :

Le sujet va recevoir un bolus initial d'insuline rapide, puis une perfusion d'insuline à débit constant et à un taux supra-physiologique. L'objectif est d'induire un plateau d'hyperinsulinisme, en sachant que les concentrations d'insulinémie vont croître pour obtenir un plateau entre 40 et 60 min. Ainsi le glucose va pénétrer massivement dans les cellules. L'insuline sera perfusée à la dose de $1 \text{ mUI} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ après un bolus d'insuline immédiat sur une minute (en mUI). Ce bolus = $\Delta \text{ d'insulinémie visé soit } [80 \text{ mIU (valeur cible)} - 10 \text{ mUI (valeur basale estimée empiriquement)}] \times \text{Vd insuline (estimé à } 100 \text{ ml/kg)} \times \text{Poids} / 1000$. Par exemple, pour un sujet de 100 kilos, le bolus est $70 \times 100 \times 100 / 1000 = 700 \text{ mUI} = 0.7 \text{ UI d'insuline}$.

En parallèle, le sujet va recevoir une perfusion à débit variable de glucose (G20) afin d'éviter toute hypoglycémie et de maintenir la glycémie à un taux constant défini par la moyenne des deux glycémies basales réalisées dans les 30 minutes avant le début du test. Le débit de glucose est fixé à 1 ou 2 mg/kg/min selon l'insulinosensibilité prévisible. La glycémie est alors mesurée toutes les 10 minutes (5 min en cas d'hypoglycémie) de façon à adapter le débit de G20 et ainsi obtenir un état d'équilibre entre l'insuline et le glucose perfusés. La glycémie sera obtenue immédiatement en utilisant un lecteur glycémique Freestyle®.

Le maintien, durant toute la durée du test, d'une insulinémie supérieure ou égale à 100 mU/l garantit le blocage de la production hépatique de glucose. Ainsi, le glucose à disposition dans l'organisme est égal au glucose perfusé uniquement. Cette mesure permet d'empêcher une production résiduelle endogène de glucose de fausser les résultats.

L'hypokaliémie induite par l'insuline est prévenue par une perfusion de phosphate dipotassique (2 ampoules dans chaque flacon de 500 ML de G20).

A la fin du protocole, pendant une heure, du Glucose 20% sans phosphate dipotassique sera perfusé à la vitesse définie en fin de protocole, et une alimentation riche en glucide sera donnée (200 g féculents (pâtes, riz) et 100 g de pain (2 petits pains)).

- Critères calculés

Ce test permet de déterminer la sensibilité d'un sujet à l'insuline : plus un sujet consomme du glucose durant le test, plus ce dernier sera sensible à l'insuline.

L'état d'équilibre est considéré comme atteint lors des 30 dernières minutes du palier. Cette période permet le calcul du GIR et du SI.

La sensibilité à l'insuline de chaque patient va être définie par deux indices :

1- Le Glucose Infusion Rate, calculé sur la consommation réelle de G20 % sur les 30 dernières minutes du test

2- L'indice de sensibilité à l'insuline calculé à partir du paramètre précédant, mais corrigé pour la glycémie à l'état d'équilibre et les variations d'insuline: $SI\ Clamp = (M / G \times \Delta I)$

M = Glucose à disposition dans l'organisme soit Taux moyen de glucose perfusé à l'état d'équilibre

G = glycémie à l'équilibre

ΔI = différence entre insulinémie à l'équilibre et insulinémie à jeun

5.1.2.3 - Analyse des anomalies structurelles et fonctionnelles du cœur.

L'ensemble de la population étudiée bénéficiera d'une écho-doppler cardiaque avec un appareil Vivid E9 (GE, Horten, Norway) en décubitus latéral gauche avec la détermination de différents paramètres :

- Fraction d'éjection systolique du VG, VTDVG et VTSVG (Simpson Bi-plan et 3D)
- Index de masse cardiaque du VG (ASE et méthode 3D)
- Pic ondes E et A, rapport E/A, pente onde E, TRIVG (Doppler pulsé)
- Flux des veines pulmonaires (Ap)
- Vitesse de propagation (Vp) du flux mitral en doppler couleur et mode TM
- Pressions de remplissages du VG (E/E', E/Vp et Ap - Am)
- Pic ondes S', E' et A' télé diastolique (DTI à l'annaux mitral)
- Une analyse de la fonction systolique et diastolique globale et segmentaire en doppler tissulaire sera réalisées (Strain) par speckle tracking en utilisant la station de travail Echopac (GE, Vingmed ultrasound AS, Horten, Norway).

5.2 Critères de tolérance

5.2.1 Définition des critères de tolérance

Tout événement indésirable sera noté dans le dossier du sujet et permettra d'analyser la tolérance des 2 techniques.

5.2.2 Méthodes et calendriers prévus pour mesurer, recueillir, analyser les paramètres d'évaluation de la tolérance

Le recueil des événements indésirables sera fait lors de chaque consultation ou hospitalisation prévues dans l'étude.

Une analyse descriptive en sera ensuite faite.

Si un fait nouveau apparaît, le comité de surveillance de la sécurité de l'étude en sera informé.

5.3 Critères de contrôle de la compliance

5.3.1 Définition des critères de contrôle de la compliance

Les épreuves étant réalisées dans le cadre d'une hospitalisation, la compliance est maîtrisée par l'équipe de soins.

5.3.2 Méthodes de mesure de la compliance

Traçabilité de tout acte réalisé dans le cadre de la recherche : prélèvements sanguins, perfusion.

6. Réalisation pratique du protocole

NB : Tous les actes pratiqués au cours de cette étude sont spécifiques à la recherche et ne font en aucun cas partie du soin.

6.1 Pré-screening.

Les sujets de la base du CIC répondant aux critères d'inclusion seront contactés par téléphone par un pharmacien du CIC. L'étude leur sera expliquée en détail et le formulaire d'information leur sera envoyé s'ils sont intéressés. Les personnes ayant vu l'annonce dans la presse écrite contacteront le CIC, et de la même manière, recevront une information orale puis bénéficieront de l'envoi du formulaire d'information s'ils sont d'accord.

Ensuite, les infirmières du CIC rappelleront les sujets pour fixer le rendez-vous pour la visite d'inclusion. Cette organisation permettra de laisser un temps de réflexion aux volontaires. Ce délai sera d'au moins 48 heures.

6.2 Visite N°1 : Inclusion (J-7 à J-1)

Elle sera réalisée au CIC du CHU de Grenoble au plus 7 jours avant les épreuves de scintigraphie ou clamp euglycémique hyperinsulinique.

A la visite d'inclusion (V1), l'investigateur du CIC vérifiera si les sujets répondent à l'ensemble des critères d'inclusion de l'étude. Un examen clinique préalable à la recherche sera conduit.

Il réexpliquera le déroulement de l'étude aux sujets et répondra aux éventuelles questions des patients sur l'étude. Il recueillera leur consentement écrit.

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Examen clinique
- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Electrocardiogramme
- Recueil urinaire (analyse par bandelette) et dosage de la microalbuminurie sur échantillon (20ml)
- Test de grossesse urinaire pour les femmes
- Prélèvement sanguin (49ml) : Numération formule sanguine (NFS) plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT (Aspartate Amino Transférase), ALAT (Alanine Amino Transférase), PAL (Phosphatase alcaline), bilirubine, γ GT (gamma glutamyl transférase), TP (taux de prothrombine), TCA (Temps de Céphaline Activée), HbA1c (Hémoglobine glyquée), cholestérol, triglycérides, HDL (High density Lipoprotéine), LDL (Low density lipoprotéine), glycémie, insulémie, TSH (Thyréostimuline).

La liste des traitements pris au cours du mois précédent sera établie.

Deux comprimés d'Iodure de potassium à 65mg seront dispensés au volontaire. Ils permettront le blocage préventif de la thyroïde et donc protégerons d'une irradiation excessive lors de la scintigraphie. Il lui sera demandé de prendre 2 comprimés à 65mg le soir la veille de la scintigraphie.

6.3 Visite N°2 (J0)

Les sujets seront admis en début de matinée, un mardi ou un jeudi, dans le service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble pour une hospitalisation d'une matinée.

Ils devront être à jeun depuis au moins 8 heures. Sinon, la visite sera reportée.

L'investigateur vérifiera que les comprimés d'Iodure de potassium ont bien été pris la veille au soir. Si ce n'est pas le cas, ils seront pris dès l'arrivée en médecine nucléaire

Les examens suivants seront ensuite pratiqués :

- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Test de grossesse urinaire pour les femmes

Les critères d'exclusion imposés par la réalisation du test hypoglycémique seront vérifiés (annexe 17.13).

Ils recevront au temps t0, une première injection de 6-DIG à la dose de 92,5 MBq (selon le mode d'administration décrit au chapitre 7.2.1.) puis une injection d'insuline, 30 minutes plus tard soit à t30 et enfin une seconde injection de 6-DIG (92,5 MBq), 5 minutes après l'injection d'insuline soit à t35.

L'insuline sera injectée par voie intraveineuse, en 30 secondes, à la dose 0,10 U/kg de poids pour les sujets insulinosensibles et de 0,15 à 0,20 U/kg de poids pour les sujets insulino-résistants (0,15 U/kg si IMC < 25 kg/m²- 0,20 U/kg si IMC ≥ 25 kg/m²) selon le protocole figurant en annexe 17.13.

La seringue ayant servi à l'injection du 6-DIG, sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

La glycémie sera analysée par un lecteur de glycémie, juste avant le départ du patient du service, afin d'éliminer tout risque d'hypoglycémie (glycémie capillaire, FreeStyle® Abbot).

Conformément à la procédure du test d'hypoglycémie insulinique, des dosages de glycémie supplémentaires seront effectués au lecteur de glycémie en cas d'apparition de symptômes cliniques en rapport avec l'hypoglycémie induite.

A l'état basal puis après injection d'insuline, deux acquisitions dynamiques scintigraphiques de 30 minutes seront réalisées pour l'ensemble de la population étudiée.

Un petit déjeuner sera remis au sujet après la fin du test, une fois l'examen scintigraphique finalisé.

La préparation du 6-DIG sera réalisée par la radiopharmacie du CHU de Grenoble.

L'injection du 6-DIG sera réalisée par le manipulateur de radiologie du service de médecine nucléaire en présence du médecin de médecine nucléaire. La seringue ayant servi à l'injection sera rapportée au laboratoire de radiopharmacie.

L'injection d'insuline sera réalisée par une infirmière (manipulateur) du service de médecine nucléaire en présence du médecin diabétologue de l'étude ou d'un médecin formé à la surveillance médicale du test d'hypoglycémie insulinique et du médecin de médecine nucléaire.

La surveillance clinique des sujets, pendant la phase d'hypoglycémie, s'effectuera sous la responsabilité du médecin diabétologue ou d'un médecin formé à la surveillance médicale du test d'hypoglycémie insulinique assisté par une infirmière (manipulateur) du service de médecine nucléaire qui sera présente en permanence au lit du sujet. Les symptômes cliniques de l'hypoglycémie seront pris en charge par resucrage per os voir IV (Procédure en annexe).

Avant sa sortie et après l'examen de médecine nucléaire le patient bénéficiera d'une échographie cardiaque trans-thoracique par un cardiologue expert en imagerie qui portera un tablier plombé.

Le sujet bénéficiera tout au long de son hospitalisation de 4 heures, d'une surveillance médicale étroite, organisée autour de l'équipe suivante :

- Infirmières du service de médecine nucléaire présente dans le service
- Médecin de médecine nucléaire présent dans le service

En cas de survenue, au cours de l'hospitalisation, d'une urgence vitale inopinée, la procédure SIERRA du CHU de Grenoble sera activée par le personnel médical ou paramédical présent auprès du sujet. Elle déclenchera la mobilisation d'un réanimateur du CHU ou en cas d'empêchement de ce dernier, l'intervention du Service Mobile d'Urgence et de Réanimation (SMUR).

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis et notifiés dans le cahier de recueil de données par le médecin de médecine nucléaire.

Il sera demandé au sujet de prendre, à domicile, 2 comprimés d'iodure de potassium à 65mg 12 à 24 heures après l'injection de 6-DIG.

6.4 Visite N°3 (J-2 à J2)

Cette visite doit avoir lieu au plus 48h avant ou après la V2.

Concerne les patients qui bénéficieront de la technique scintigraphique au 6DIG + clamp euglycémique hyperinsulinique

Les sujets seront admis en début de matinée au centre d'investigation clinique du CHU de Grenoble pour une hospitalisation de 4 heures.

Ils devront être à jeun depuis au moins 12 heures. Sinon, la visite sera reportée.

Les examens suivants seront d'abord pratiqués :

- Mesure du poids et de la taille avec calcul de l'IMC
- Test de grossesse urinaire pour les femmes

Il sera ensuite conseillé au patient d'uriner car, par la suite, les déplacements seront plus difficiles. Les objets métalliques devront également être enlevés (chaines, bijoux, piercing, lunettes, ...)

Une fois le volontaire allongé, une mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos sera faite.

Ensuite, un premier cathéter sera inséré sur la veine du pli du coude d'un bras, et servira à perfuser le glucose et l'insuline. Un coussin chauffant sera alors posé sur l'avant-bras pour augmenter le débit de retour veineux et améliorer la tolérance de la perfusion (dilution de l'insuline et glucose dans un plus grand volume). Un second cathéter sera placé sur une veine de l'avant-bras controlatéral. Celui servira à recueillir les échantillons sanguins. Le premier prélèvement pour la glycémie et l'insulinémie à T-30min sera réalisé puis un garde-veine sera mis en place. Un second prélèvement pour la glycémie et l'insulinémie sera réalisé à T0. De façon concomitante, une glycémie capillaire sera dosée immédiatement et servira de glycémie cible pour la suite du test.

La perfusion d'insuline commencera au temps t_0 à un débit de 1 mU/Kg.min^{-1} pendant 120 minutes après un bolus de $[80-10 \times (\text{poids.100})/1000]$. Par exemple, pour un sujet de 100 kilos, le bolus est $70 \times 100 \times 100 / 1000 \text{ mUI}$, soit 0,7 UI d'insuline.

L'infusion de glucose 20% (G20) dans lequel le phosphate dipotassique à 17,42% a été ajouté (2 ampoules pour 500 mL de G20) commence immédiatement après le début du bolus d'insuline, à un débit de $1 \text{ à } 2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ selon l'avis médical (anticipation de l'insulinorésistance) puis augmentera ou sera adapté par pallier toutes les 10 minutes afin d'obtenir l'état d'équilibre avant t_{90} et maintenir une glycémie proche des valeurs basales $\pm 5\%$. Le phosphate dipotassique est nécessaire afin d'éviter toute hypokaliémie induite chez le sujet par l'insuline.

Les paramètres mesurés lors de ces épreuves seront les suivants :

- Fréquence cardiaque, tension artérielle: à l'arrivée, à la fin du clamp et juste avant le départ du patient.
- Insulinémie, Glycémie et biothèque: T-30, T0 puis toutes les 10 minutes entre t90 et t120. Seule une goutte pour glycémie capillaire sera utilisée entre t10 et t80

Les prélèvements sanguins seront réalisés à l'aide d'une seringue de 10ml après un premier prélèvement de 0,5ml pour purge. A chaque temps, 6 ml seront prélevés sauf à T120 où 10ml seront prélevés. La première goutte de chaque prélèvement sera utilisée pour la mesure de la glycémie veineuse immédiate avec le lecteur glycémique Freestyle®. Le reste du sang sera réparti dans les différents tubes (insulinémie au laboratoire et biothèque). Cela représente un total de 52 ml de sang pour toute l'épreuve.

A la fin des 2 heures de clamp, une perfusion de G20 **sans phosphate dipotassique** sera maintenue pendant une heure au débit déterminé à t120, celle d'insuline stoppée. Le cathéter ayant servi aux prélèvements sera retiré après avoir vérifié la glycémie. Un repas hyperglucidique sera servi au patient. Il doit contenir au moins 200g de féculents et 100g de pain.

Un contrôle de la glycémie capillaire sera réalisé à T150 (30minutes après la fin de la perfusion d'insuline) et à T180 (1h après la fin du clamp). La sortie du sujet sera autorisée par le médecin si la dernière glycémie est normale ou élevée. Il sera donné au sujet 4 biscottes et 2 morceaux de sucre lors de son départ, à utiliser en cas de signe d'hypoglycémie sur le chemin du retour. Ils auront reçu une description afin de reconnaître ces signes. Il leur sera interdit de repartir en vélo ou en voiture en tant que conducteur.

La perfusion d'insuline, de glucose et de phosphate dipotassique, et les prélèvements sanguins seront réalisés par une infirmière du CIC en présence d'un médecin formé à la surveillance médicale du test du clamp euglycémique hyperinsulinique. L'adaptation du débit de perfusion du glucose sera calculée par le médecin.

La surveillance clinique des sujets, pendant le test, s'effectuera sous la responsabilité d'un médecin formé à la surveillance médicale du clamp euglycémique hyperinsulinique, assisté par une infirmière du CIC qui sera présente en permanence au lit du sujet.

En cas de survenue, au cours de l'hospitalisation, d'une urgence vitale inopinée, la procédure SIERRA du CHU de Grenoble sera activée par le personnel médical ou paramédical présent

auprès du sujet. Elle déclenchera la mobilisation d'un réanimateur du CHU ou en cas d'empêchement de ce dernier, l'intervention du SMUR.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis et notifiés dans le cahier de recueil de données par le médecin.

6.5 Visite N°4

En fin d'étude, 2 semaines ($\pm$ 7 jours) après la dernière période d'hospitalisation, une visite de fin d'étude aura lieu au CIC du CHU de Grenoble.

Les examens suivants seront pratiqués :

- Examen clinique
- Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque de repos
- Electrocardiogramme
- Recueil urinaire (analyse par bandelette) et dosage de la microalbuminurie sur échantillon (20ml)
- Prélèvement sanguin (49ml) : NFS plaquettes, natrémie, kaliémie, urée, créatinine, clairance de la créatinine (formule de Cockcroft), ASAT, ALAT, PAL, bilirubine, γ GT, TP (taux de prothrombine), TCA, HbA1c, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, glycémie, insulínémie, TSH.

Les effets indésirables et les traitements concomitants seront recueillis.

6.6 Visite de sortie d'étude prématurée

En cas de sortie prématurée de l'étude, il sera demandé au sujet de venir pour une visite de fin d'étude anticipée comportant au minimum un examen clinique, mesure de la pression artérielle, fréquence cardiaque et un électrocardiogramme (ECG) ; et au maximum le contenu de la visite normale de fin d'étude. Si la personne ne souhaite pas se déplacer, un entretien téléphonique sera réalisé par le médecin du CIC pour s'assurer qu'aucun événement indésirable grave n'est survenu.

6.7 Fin de recherche

6.7.1 Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire d'une partie ou de la totalité de la recherche

La recherche pourra être arrêtée temporairement ou définitivement sur décision du promoteur, du comité de surveillance de la sécurité de l'étude et/ou de l'Agence nationale de Sécurité des médicaments et produits de Santé (ANSM).

6.7.2 Définition de la fin de la recherche sur les personnes

Non applicable, il s'agit de la dernière visite du dernier sujet participant

7. Recueil et traitement des données

9.1 Description des données recueillies

9.1.1 Paramètres cliniques

Fréquence cardiaque : DRÄGER INFINITY GAMMA XL[®]

Tension artérielle : DRÄGER INFINITY GAMMA XL[®]

Poids : Balance électronique

Taille : Toise manuelle

9.1.2 Paramètres para-cliniques

- Electrocardiogramme :

Au CIC : AGILENT, M3046A – M30000A

En médecine nucléaire : CASE8000 (ECG d'épreuve d'effort), General Electric[®] (n° de série : C20G03295)

- Appareil scintigraphie : gamma caméra General Electric[®] de type Infinia; (n° de série 17332), puis stockage des données sur CD ROM via le système de gravure CD/DDV de marque Keosys, type Visio plus Storage (n° de série 07110101).

9.1.3 Paramètres biologiques

Dosages sanguins :

- La numération sanguine :

→ L'hémoglobine est mesurée par une méthode spectrophotométrique après lyse des hématies.

→ Les globules rouges, leucocytes et plaquettes sont mesurés par impédancemétrie.

→ le Volume Globulaire moyen (VGM) est mesuré par impédancemétrie (technique Coulter).

→ L'hématocrite, la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH), et la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH) sont calculés.

- Le sodium est mesuré par une méthode potentiométrique directe ou indirecte.

- Le potassium est mesuré par une méthode potentiométrique directe ou indirecte.

- La créatinine est mesurée par une méthode de colorimétrie cinétique ou enzymatique.
- L'urée est mesurée par une méthode de colorimétrie enzymatique.
- La bilirubine totale est mesurée par une méthode de colorimétrie enzymatique.
- Les ASAT et ALAT sont mesurées par spectrophotométrie.
- Les PAL sont mesurées par coloration cytochimique.
- Les GGT sont mesurées par spectrophotométrie.
- Le TCA et le TP sont mesurés par des méthodes chronométriques.
- Le bilan lipidique (cholestérol total, HDL et LDL, triglycérides) est réalisé avec une méthode colorimétrique automatisée.
- Le bilan thyroïdien (TSH) est réalisé par méthode radio-immunologique.
- Le glucose est mesuré soit par une méthode de colorimétrie enzymatique au DTPI, soit avec le lecteur de glycémie Freestyle® par une méthode de colorimétrie avec lecture par photométrie
- L'insuline est mesurée par une méthode radio-immunologique manuelle
- L'hémoglobine glyquée (HbA1c) est mesurée par une méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Dosages urinaires :

- Protéine, glucose, leucocytes, hématies et pH sont détectés avec une bandelette urinaire.
- La microalbuminurie sera mesurée par immunoprécipitation (Néphélomètre BN II Dade/Behring(Siemens)).

8. Analyse statistique des données

10.1 Responsable de l'analyse statistique

- Rédacteur du plan d'analyse statistique : Dr Enkelejda Hodaj, Médecin Biostatisticien CIC Grenoble
- Personne chargée de réaliser l'analyse : Statisticien du CIC Grenoble

10.2 Calcul d'effectif

En vue de ressources matérielles et humaines disponibles, il a été choisi d'inclure dans l'étude 20 sujets pour l'étude de la validité de la nouvelle technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG par rapport à la technique de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinique.

L'article de Gutt ([Gutt M, 2000](#)) montre une corrélation de 0,63 entre l'index de l'insulinosensitivité obtenu pendant l'HGPO et celui obtenu avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique.

Avec 20 sujets, nous pouvons démontrer une corrélation de 0,60 significativement différente de l'absence de corrélation au seuil de 5% avec une puissance de 81% (Source NQuery Advisor® 7.0 pour Windows) entre la nouvelle technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG et la technique de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinique.

10.3 Description du plan d'analyse statistique

Seuil statistique et conditions d'applications

L'analyse statistique sera réalisée après les procédures habituelles de management des données et gel de base avec le logiciel Stata 11 ou plus sous Windows.

Lors d'un test, le seuil statistique (α) retenu pour considérer une différence comme statistiquement significative sera p inférieur ou égal à 0,05.

Le test de Shapiro-Wilks sera utilisé pour démontrer la normalité des paramètres. En cas de non-normalité une transformation logarithmique ou autre sera proposée pour obtenir la normalité des paramètres. Le test de Levene sera utilisé pour tester l'homogénéité des variances.

Les paramètres quantitatifs pour lesquels la normalité aura été admise seront décrits par la moyenne $\pm$ écart-type, l'intervalle de confiance à 95% ainsi que le 5ème et 95ème percentiles. Ils seront exprimés en médiane et interquartile lorsque la normalité aura été rejetée.

Les paramètres qualitatifs seront exprimés en effectif et pourcentage. Les variables catégorielles seront résumées par des statistiques descriptives à chaque temps de l'évaluation et dans chaque groupe : effectif et fréquence.

Populations d'analyse

L'analyse descriptive des paramètres sera réalisée sur la population en intention de traiter.

L'analyse de l'accord entre les deux techniques de l'insulinorésistance sera réalisée sur la population de sujets pour lesquels un résultat est disponible pour chacune des techniques de mesure.

L'analyse de la reproductibilité sera réalisée sur la population constituée des sujets pour lesquels un résultat est disponible pour chaque mesure de scintigraphie avec le 6-DIG effectuée.

L'analyse de faisabilité / tolérance inclura tous les sujets inclus dans l'étude, pour lesquels un examen de scintigraphie avec le 6-DIG a été programmé.

Aucune méthode de remplacement de données ne sera mise en œuvre.

10.3.1 Analyse des critères principaux

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le niveau d'accord entre la nouvelle technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG et la technique de référence : le clamp euglycémique hyperinsulinique. Nous sommes dans la situation d'une comparaison de deux mesures quantitatives, mesurées de deux façons différentes.

Dans un premier temps, le coefficient de corrélation de Pearson sera ensuite calculé. Si échec de normalité des paramètres, nous utiliserons le coefficient de corrélation non paramétrique de Spearman. Ensuite nous présenterons la dispersion du nuage de points et la régression linéaire effectuée pour évaluer la relation entre l'IR mesuré par la scintigraphie et chacun des deux paramètres du clamp, GIR et SI. En cas de non-normalité, une transformation logarithmique ou autre sera proposée pour obtenir la normalité des paramètres.

Dans un second temps, à titre indicatif nous fournirons l'évaluation de la concordance par la méthode graphique de Bland et Altman dans laquelle la différence entre deux mesures est tracée contre leur moyenne, avec l'intervalle de confiance à 95% (limites de l'accord). Dans ce cas nous n'utiliserons pas les grandeurs absolues mais leurs valeurs relatives. La méthode de transformation en valeurs relatives à adopter sera choisie au moment de l'analyse en fonction des propriétés de la distribution des variables.

10.3.2 Analyse des critères secondaires

Objectif 2:

L'étude de faisabilité de la technique de mesure de l'insulinorésistance par scintigraphie avec le 6-DIG chez des sujets insulinosensibles et des sujets insulinorésistant sera réalisée par une analyse descriptive des différentes mesures réalisées. Le pourcentage de sujets chez lesquels la mesure a été réalisable sera donné pour chaque groupe de patients, encadré par un intervalle de confiance à 95 %.

Objectif 3 :

L'évaluation de la tolérance sera descriptive. Pour chaque groupe et chaque événement indésirable, la fréquence des événements, l'effectif et le pourcentage de sujets sera calculé et présenté selon la classification MedDRA par système-organe (MedDRA SOCs). Un recueil systématique des événements indésirables sera effectué dans ce but.

L'évaluation du confort sera descriptive sur des critères à définir.

Objectif 4 :

La reproductibilité inter et intra opérateur sera évalué par le coefficient de corrélation intra-classe avec son intervalle de confiance à 95%.

La méthode graphique de Bland et Altman, dans laquelle la différence entre deux mesures est tracée contre leur moyenne, avec l'intervalle de confiance à 95% (limites de l'accord) complétera cette évaluation.

Objectif 5 :

Une analyse descriptive de tous les paramètres évalués pendant écho-doppler cardiaque sera donnée. La liaison entre les anomalies structurelles et fonctionnelles cardiaques et le désordre métabolique de l'insulinorésistance sera évalué selon la nature des paramètres par le coefficient de corrélation de Pearson ou le test de Student; si les conditions d'application des tests paramétriques ne sont pas respectées les tests non-paramétriques seront utilisés.

Références bibliographiques

BIBLIOGRAPHIE :

Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2007; 30:89-94.

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH Jr, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 358 : 2545-2559.

ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 358: 2560-2572.

Almgren T, Wilhelmsen L, Samuelsson O, Himmelmann A, Rosengren A, Andersson OK. Diabetes in treated hypertension is common and carries a high cardiovascular risk: results from a 28-year follow-up. *J Hypertens* 2007;25:1311- 1317.

An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1489-506.

Arnlov J, Lind L, Zethelius B, Andrén B, Hales CN, Vessby B, Lithell H. Several factors associated with the insulin resistance syndrome are predictors of left ventricular systolic dysfunction in a male population after 20 years of follow-up. *Am Heart J* 2001;142:720–724.

Baber DC. The use of principal components in the quantitative analysis of gamma camera dynamic studies. *Phys Med Biol.* 1980;25:283-292.

Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli FH, Phillips RA, Raskin P, Wright JT Jr, Oakes R, Lukas MA, Anderson KM, Bell DS; GEMINI Investigators. Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292: 2227–2236.

Bays HE. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:2461-2473.

Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, and Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279: E1104–E1113.

Benali H, Buvat I, Frouin F, Bazin JP, Di Paola R. Foundations of factor analysis of medical image sequences. *Image and Vision Computing.* 1994;12: 375-385.

Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Cobelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979 Jun;236:E667-77.

Bertoldo A, Peltoniemi P, Oikonen V, Knuuti J, Nuutila P, Cobelli C. Kinetic modeling of [(18)F]FDG in skeletal muscle by PET: a four-compartment five-rate-constant model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E524-36.

Bertoldo A, Price J, Mathis C, Mason S, Holt D, Kelley C, Cobelli C, Kelley DE. Quantitative assessment of glucose transport in human skeletal muscle: dynamic positron emission tomography imaging of [O-

methyl-11C]3-O-methyl-D-glucose. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90: 1752-1759.

Bignan G et al. Dérivés iodés de monosaccharides utilisables comme produits radiopharmaceutiques. N° 95 95214 du 2 mai 1995. Demande déposée au nom de Eraslabo, St Nazaire les Eymes.

Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. Lancet 2006 ; 368 : 29-36.

Botker HE, Moller N, Schmitz O, Bagger JP, Nielsen TT. Myocardial insulin resistance in patients with syndrome X. J Clin Invest. 1997; 100 : 1919-1927.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. Circulation 2007;115:3213-3223.

Briat A, Slimani L, Perret P, Villemain D, Halimi S, Demongeot J, Fagret D, Ghezzi C. In vivo assessment of cardiac insulin resistance by nuclear probes using an iodinated tracer of glucose transport. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007; 34: 1756-1764.

Carruthers A. Facilitated diffusion of glucose. Physiol Rev 1990;70:1135-1176.

Coughlin SS, Pearle DL, Baughman KL, Wasserman A, Tefft MC. Diabetes mellitus and risk of idiopathic dilated cardiomyopathy. The Washington, DC Dilated Cardiomyopathy Study. Ann Epidemiol- 1994;4:67-74.

Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. Annu Rev Med

2003;54:453–471.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004;53:1285-1292.

DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab Gastrointest Physiol*. 1979;237:E214–E223.

DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981; 30: 1000-1007.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC(HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 2008;10: 933–989.

Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD; VADT Investigators. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009; 360: 129-139.

Eurich DT, McAlister FA, Blackburn DF, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Varney J, Johnson JA. Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: Systematic review. *BMJ* 2007;335:497.

Fagret D, Ghezzi C, Perret P et Demongeot J. Nouveau procédé de mesure de la résistance à l'insuline. Demande déposée au nom de l'Université Joseph Fourier et de l'INSERM, Juillet 2008.

Feinendegen LE, Herzog H, Wieler H, Patton DD, Schmid A. Glucose transport and utilization in the human brain: model using carbon-11 methylglucose and positron emission tomography. *J Nucl Med.* 1986;27:1867-1877.

Fragasso G, Pallosi A, Puccetti P, Silipigni C, Rossodivita A, Pala M, Calori G, Alfieri O, Margonato A. A randomized clinical trial of trimetazidine, a partial free fatty acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:992– 998.

Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103:357– 362.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. *Lancet.* 2011;377:557-567.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:403–414.

Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* 1998;101:2377–86.

Greenfield MS, Doberne L, Kraemer F, Tobey T, Reaven G. Assessment of insulin resistance with the insulin suppression test and the euglycemic clamp. *Diabetes*. 1981;30:387-392.

Grundy, S.M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:629-636.

Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47:177-184.

Hallsten K, Virtanen KA, Lonnqvist F, et al. Enhancement of insulin-stimulated myocardial glucose uptake in patients with type 2 diabetes treated with rosiglitazone. *Diabet Med* 2004;21:1280 –1287.

Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy. *JAMA* 1974;229:1749 –1754.

Hasegawa S, Kusuoka H, Maruyama K, Nishimura T, Hori M, Hatazawa J. Myocardial positron emission computed tomographic images obtained with fluorine-18 fluoro-2-deoxyglucose predict the response of idiopathic dilated cardiomyopathy patients to betablockers. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:224 –233.

Henry C, Koumanov F, Ghezzi C, Morin C, Mathieu JP, Vidal M, de Leiris J, Comet M, Fagret D. [123I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG): A potential tracer of glucose transport. Nucl Med Biol. 1997; 24: 527-534.

Henry C, Tanti JF, Grémeaux T, Morin C, Van Obberghen E, Comet M, Le Marchand-Brustel Y. Characterization of 6-deoxy-6-iodo-D-glucose: A potential new tool to assess glucose transport. Nucl Med Biol. 1997; 24: 99-104.

Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. N Engl J Med. 2007; 356: 213-215.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature 2006;440:944-948.

Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. Insulin resistance and risk of congestive heart failure. JAMA 2005;294: 334–41.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes. 2000;49:1939–1945.

Iozzo P, Chareonthaitawee P, Dutka D, Betteridge DJ, Ferrannini E, Camici PG. Independent association of type 2 diabetes and coronary artery disease with myocardial insulin resistance. Diabetes. 2002; 51 : 3020-3024.

Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S, Selby JV. Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. *Circulation* 2001;103: 2668–2673.

Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, Chalmers JW, Capewell S, McMurray JJ. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 2009; 119: 515–523.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2402-2410.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middleaged men. *JAMA* 2002 ; 288:2709–2716.

Lebovitz HE. Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem* 1999;45:1339–1345.

Lee L, Campbell R, Scheuermann-Freestone M, Taylor R, Gunaruwan P, Williams L, Ashrafian H, Horowitz J, Fraser AG, Clarke K, Frenneaux M. Metabolic modulation with perhexiline in chronic heart failure: a randomized, controlled trial of short-term use of a novel treatment. *Circulation* 2005;112:3280–3288.

Malaisse WJ, Ladrière L, Sener A. Pancreatic Fate of 6-Deoxy-6-[125I]-Iodo-D-Glucose. In *Vivo*

Experiments. *Endocrine*. 2000; 13: 411-416.

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, Williams GR. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004;110:1245–1250.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A et al. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007; 28: 1462-1536.

Mari A, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2001;24:539-548.

Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999 ;22:1462-1470.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–419.

Mayer J. Ueber den zusammenhang des diabetes mellitus mit erkrankungen des herzens. *Zeitschr Klin Med* 1888;14:212–239.

Mokdad, A.H., E.S. Ford, B.A. Bowman, D.E. Nelson, M.M. Engelgau, F. Vinicor, and J.S. Marks.

Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care*. 2000;23:1278-1283.

Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol*. 2002;16:1931–1942.

Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294:E15-26.

Muniyappa R, Chen H, Muzumdar R, Einstein FH, Yan X, Yue LQ, Barzilai N, Quon MJ. Comparison between Surrogate Indexes of Insulin Sensitivity/Resistance and Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp Estimates in Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1023-1029.

Nikolaidis LA, Elahi D, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Zourelas L, Stolarski C, Shen YT, Shannon RP. Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:955-961.

Nikolaidis LA, Sturzu A, Stolarski C, Elahi D, Shen YT, Shannon RP. The development of myocardial insulin resistance in conscious dogs with advanced dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2004; 61:297–306.

Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007;356:2457–2471.

Nuutila P, Koivisto VA, Knuuti J, Ruotsalainen U, Teräs M, Haaparanta M, Bergman J, Solin O, Voipio-Pulkki LM, Wegelius U, et al. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest.* 1992; 89:1767-1774.

Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA* 2012;307:483-490.

Pacini G, Mari A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:305-322.

Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Gambardella A, Gualdiero P, Lama D, Varricchio G, Gentile S, Varricchio M. Prognostic importance of insulin-mediated glucose uptake in aged patients with congestive heart failure secondary to mitral and/or aortic valve disease. *Am J Cardiol* 1999;83:1338–1344.

Paolisso G, Manzella D, Rizzo MR, Ragno E, Barbieri M, Varricchio G, Varricchio M. Elevated plasma fatty acid concentrations stimulate the cardiac autonomic nervous system in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:723–730.

Park, S.Y., Y.R. Cho, H.J. Kim, T. Higashimori, C. Danton, M.K. Lee, A. Dey, B. Rothermel, Y.B. Kim, A. Kalinowski, K.S. Russell, and J.K. Kim. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes.* 2005 ; 54: 3530-3540.

Paternostro G, Camici PG, Lammerstma AA, Marinho N, Baliga RR, Kooner JS, Radda GK, Ferrannini E. Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary heart disease. A study with positron emission tomography. *J Clin Invest.* 1996; 98 : 2094-2099.

Perret P, Ghezzi C, Mathieu JP, Morin C, Fagret D. Assessment of insulin-sensitivity in vivo in control and diabetic mice, with a tracer of glucose transport: [125I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003; 19: 306-312.

Perret P, Slimani L, Briat A, Villemain D, Halimi S, Demongeot J, Fagret D, Ghezzi C. Assessment of insulin resistance in fructose-fed rats with 125I-6-deoxy-6-iodo-D- glucose, a new tracer of glucose transport. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007; 34: 734-744.

Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 1999;48:1600–1606.

Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H813–H822.

Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin End Metab.* 2000; 85:4426-4433.

Radziuk J, Pye S. Quantitation of basal endogenous glucose production in Type II diabetes: importance of the volume of distribution. *Diabetologia*. 2002;45:1053-84.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963 ; 1 : 785-789.

Read PA, Khan FZ, Heck PM, Hoole SP, Dutka DP. DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with CAD. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3:195–201.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-1607.

Reaven, G.M. The fourth musketeer--from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*. 1995 ; 38: 3-13.

Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 2005;47:201–210.

Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR; UKPDS Study Group. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes* 2006 ; 55:1832-1839.

Roden M, Shulman GI. Applications of NMR spectroscopy to study muscle glycogen metabolism in man. *Annu Rev Med*. 1999;50:277-290.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2859-2865.

Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. N.m.r. studies of muscle glycogen synthesis in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Biochem Soc Trans.* 1991;19:992-994.

Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, Cosentino F, Jönsson B, Laakso M, Malmberg K, Priori S, Ostergren J, Tuomilehto J, Thrainsdottir I, Vanhorebeek I, Stramba-Badiale M, Lindgren P, Qiao Q, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL, Deckers JW, Bertrand M, Charbonnel B, Erdmann E, Ferrannini E, Flyvbjerg A, Gohlke H, Juanatey JR, Graham I, Monteiro PF, Parhofer K, Pyörälä K, Raz I, Schernthaner G, Volpe M, Wood D. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J.* 2007; 28: 88-136.

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972 ; 30 : 595-602.

Saad MF, Anderson RL, Laws A, Watanabe RM, Kades WW, Chen YD, Sands RE, Pei D, Savage PJ, Bergman RN. A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance. *Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Diabetes.* 1994;43:1114-1121.

Sattar N, McConnachie A, Shaper AG, Blauw GJ, Buckley BM, et al. Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies. *Lancet* 2008 ; 371:1927–1935.

Schramm TK, Gislason GH, Køber L, Rasmussen S, Rasmussen JN, Abildstrøm SZ, Hansen ML, Folke F, Buch P, Madsen M, Vaag A, Torp-Pedersen C. Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and nondiabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk. A population study of 3.3 million people. *Circulation*.2008;117:1945-1954.

Shafazand M, Schaufelberger M, Lappas G, Swedberg K, Rosengren A. Survival trends in men and women with heart failure of ischaemic and non-ischaemic origin: data for the period 1987–2003 from the Swedish Hospital Discharge Registry. *Eur Heart J* 2009; 30: 671–678.

Shoelson S, Lee J, Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793– 801.

Shulman GI. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:183–190.

Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, Ahlin S, Anveden Å, Bengtsson C, Bergmark G, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Karlsson J, Lindroos AK, Lönroth H, Narbro K, Näslund I, Olbers T, Svensson PA, Carlsson LM. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA*. 2012;307:56-65.

Slimani L, Perret P, Briat A, Villemain D, Ghezzi C, Fagret D, Demongeot J. Multicompartmental modelling and experimental design for glucose transport studies in insulin-resistant rats. *C R Biol* 2002 ;

325:529-546.

Soonthornpun S, Setasuban W, Thamprasit A, Chayanunnukul W, Rattarasarn C, Geater A. Novel insulin sensitivity index derived from oral glucose tolerance test. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1019-1023.

Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Järvinen H, et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23:295-301.

Suskin N, McKelvie RS, Burns RJ, Latini R, Pericak D, Probstfield J, Rouleau JL, Sigouin C, Solymoss CB, Tsuyuki R, White M, Yusuf S. Glucose and insulin abnormalities relate to functional capacity in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 2000;21:1368–1375.

Tian R, Abel ED. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation* 2001;103:2961–2966.

Tripathy D, Almgren P, Tuomi T, Groop L. Contribution of insulin-stimulated glucose uptake and basal hepatic insulin sensitivity to surrogate measures of insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2004;27:2204-2210.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343–1350.

Verdecchia P, Reboldi G, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Telera MP, Santeusano F, Porcellati C, Brunetti P. Circulating insulin and insulin growth factor-1 are independent determinants of left ventricular mass and geometry in essential hypertension. *Circulation* 1999; 100:1802–1807.

Voipio-Pulkki LM, Nuutila P, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Teräs M, Wegelius U, Koivisto VA. Heart and skeletal muscle glucose disposal in type 2 diabetic patients as determined by positron emission tomography. *J Nucl Med*. 1993; 34:2064-2067.

Wang, C.C., M.L. Goalstone, and B. Draznin. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004 ;53:2735-2740.

Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang MX, Wang J, LeMaire SA, Coselli JS, Shen YH. Free fatty acids inhibit insulin signalingstimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*. 2006;55:2301–2310.

Watanabe S, Tagawa T, Yamakawa K, Shimabukuro M, Ueda S. Inhibition of the reninangiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2376–2380.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27: 1047-1053.

Witteles RM, Fowler MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:93-102.

Wright, J.J., J. Kim, J. Buchanan, S. Boudina, S. Sena, K. Bakirtzi, O. Ilkun, H.A. Theobald, R.C. Cooksey, K.V. Kandrор, and E.D. Abel. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res*. 2009 ; 82: 351-360.

Yokoyama I, Yonekura K, Ohtake T, Kawamura H, Matsumoto A, Inoue Y, Aoyagi T, Sugiura S, Omata M, Ohtomo K, Nagai R. Role of insulin resistance in heart and skeletal muscle F-18 fluorodeoxyglucose uptake in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nucl Cardiol*. 2000; 7 : 242-248.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145–153.

Zierler KL. Fatty acids as substrates for heart and skeletal muscle. *Circ Res* 1976;39:459-463.

Zhu S, St-Onge MP, Heshka S, Heymsfield SB. Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism* 2004;53:1503-1511.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetic epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.

Annexes

Protocole du test d'hypoglycémie insulinique

Il s'agit d'un protocole validé (Ertuk et al 1998, Nye et al, 2001) et utilisé en pratique clinique pour l'évaluation simultanée des axes corticotrope et somatotrope.

Contre-indications à la réalisation du test :

- Age > 65 ans
- Risque comitial (antécédent personnel comitial, traumatisme crânien, chirurgie hypophysaire par voie haute)
- Antécédents de pathologie coronarienne
- Antécédents de troubles du rythme cardiaque
- Femme enceinte.

Méthode, description de la procédure :

Début du test en début de matinée après au moins 8h de jeûne.

Le sujet est en position allongée.

Présence médicale obligatoire.

Pose de deux cathéters veineux, 30 minutes avant le début du test :

- Un cathéter qui permettra les recueils sanguins aux différents temps
- Un cathéter qui permettra l'injection d'insuline et des produits de « resucrage »

Mise à disposition d'un lecteur de glycémie (Accu-Chek Sensor®, Roche). Les prélèvements pour la glycémie (y compris ceux destinés au lecteur de glycémie) sont réalisés sur sang veineux et non capillaire.

TO

* **Prélèvement pour dosage de la glycémie** (analyse au laboratoire et par lecteur de glycémie) puis :

* **Injection d'Insuline ordinaire (Actrapid ou Umuline Rapide), par voie IV, en 30 secondes, à la dose de :**

- **0,10 à 0,15 U/kg de poids pour les volontaires sains : 0,10 U/kg si IMC < 25 kg/m²- 0,15 U/kg si IMC ≥ 25 kg/m²**
- **0,15 à 0,20 U/kg de poids pour les sujets diabétiques : 0,15 U/kg si IMC < 25 kg/m²- 0,20 U/kg si IMC ≥ 25 kg/m²**

Suivie d'un rinçage de la voie.

T15, T30, T45, T60 minute

* **Prélèvements pour dosage de la glycémie** (analyse au laboratoire et par lecteur de glycémie). Si la glycémie mesurée sur le lecteur baisse en dessous de 2,2 mmol/l ou de plus de la moitié de la glycémie initiale, l'objectif du test est atteint. L'hypoglycémie est généralement obtenue entre 15 et 30 minutes.

Un petit déjeuner sera remis au sujet après la fin du test (T60 minutes), une fois l'examen scintigraphique de H1 finalisé.

Surveillance :

Présence médicale dès le début du test.

Surveillance stricte : Infirmière en permanence au lit du malade

L'attention est portée sur la recherche des signes cliniques en rapport avec l'hypoglycémie :

- o transpirations (63%)
- o faim (50%)
- o palpitations (51%)
- o tremblements (31%)
- o perte de conscience, convulsions (<3%)

L'endormissement est fréquent, Il faut lutter contre.

En cas d'apparition des ces symptômes :

- Un dosage de glycémie est effectué au lecteur. Si l'hypoglycémie est confirmée, la procédure de resucrage est mise en œuvre Les symptômes et les glycémies correspondantes sont notifiés dans le CRF

Procédure de resucrage:

- Si le patient est conscient, le resucrage s'effectue par voie orale : 3 sucres avec de l'eau ou une briquette de jus d'orange
- En cas de perte de connaissance : glucose 30% : 2 ampoules par voie IV stricte ou Glucagon (Glucagen®) : 1 mg par voie IV ou IM ou sous-cutanée.
- Contrôle de la glycémie à renouveler 15 à 20 minutes après le resucrage. Si l'hypoglycémie persiste, il faut renouveler la procédure de resucrage.

Références:

- Erturk E et al. Evaluation of the integrity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by insulin hypoglycemia test. Clin Endocrinol Metab, 1998, 83: 2350-2354.
- Nye EJ et al. The insulin hypoglycemia test: hypoglycemic criteria and reproducibility. J Neurol Endocrinol, 2001, 13:524-530.

Abstract et résumé

Développement d'une technique rapide de mesure de la résistance à l'insuline chez l'homme

L'insuline résistance (IR), caractérisée par une diminution cellulaire de la sensibilité à l'insuline dans les organes insulinosensibles, est un élément central de l'obésité, du syndrome métabolique, du diabète sucré et conduit à une augmentation des maladies cardiovasculaires, en particulier l'insuffisance cardiaque. Tous ces événements sont aujourd'hui de graves problèmes de santé publique. Mais actuellement, il n'existe pas d'outil simple pour mesurer la résistance à l'insuline. L'UMR_S U1039 « Radiopharmaceutiques Biocliniques » a validé un nouveau traceur du transport du glucose radiomarqué à l'iode 123 et a élaboré un protocole d'imagerie rapide et simple avec une gamma-caméra dédiée petit animal, qui permet l'obtention d'un index de résistance à l'insuline pour chaque organe, et particulièrement discriminant pour le cœur.

Ces travaux rapportent le transfert chez l'homme de cette technique de mesure, parfaitement validée chez l'animal. Le protocole d'étude a été appliqué sur 12 sujets (6 volontaires sains et 6 patients diabétiques de 2). La première partie de la thèse avait pour but d'évaluer la tolérance, la cinétique in vivo, la biodistribution et de la dosimétrie de ce nouveau traceur du transport du glucose, le [123I] - 6DIG. Nous avons montré que la sécurité du nouveau traceur et la technique de mesure sont adéquats. Il n'y a pas eu d'effets indésirables, et la tolérance de l'ensemble du protocole a été excellente. L'élimination du 6DIG est rapide, principalement dans les urines, et complète dans les 72h. La dose efficace pour un scan complet avec injection de $2 \times 92,5$ MBq est de 3 à 4 mSv. La deuxième partie de ce travail porte sur la faisabilité et la reproductibilité chez l'homme de la technique de mesure scintigraphique validée chez l'animal. La troisième partie décrit les techniques utilisées pour l'optimisation du traitement des données. Avec une méthode adaptée à une mesure chez l'homme, nous avons pu déterminer un index d'IR permettant de discriminer une population résistante d'une population sensible à l'insuline.

Nous rapportons ici la première utilisation clinique du 6DIG et décrivons une méthode d'imagerie originale pour évaluer la résistance à l'insuline myocardique.

Mots-clés : Imagerie nucléaire - 6-DIG - Diabète - Obésité - Insulino-résistance - Métabolisme cardiaque.

Development of a Fast Measurement Technique of Insulin Resistance in Human

Insulin resistance (IR), which is characterized by a depressed cellular sensitivity to insulin in insulin-sensitive organs, is a central feature of obesity, metabolic syndrome, and diabetes mellitus and leads to increase cardiovascular diseases, particularly heart failure. All these events are today serious public health problems. Nevertheless, no simple tool allowing the measurement of IR is currently available. The U1039 INSERM unit has previously validated a new tracer of glucose transport, radiolabelled with 123 iodine and has developed a fast and simple imaging protocol with a gamma-camera dedicated for small animals, which allows the obtaining of an IR-index for each organ. This tool was shown to be particularly discriminating for the heart. The project of my thesis was the transfer to human of this technique, perfectly validated in animals. The protocol was applied to 12 subjects (6 healthy volunteers and 6 type 2 diabetic patients). The first part of the thesis was aimed at evaluating tolerance, in vivo kinetics, distribution and dosimetry of the novel tracer of glucose transport, [123I]-6DIG. The safety of the tracer as well as the measurement technique was found to be adequate. There were no adverse effects with excellent tolerance of the whole protocol. 6DIG clearance was fast, primarily in urine and complete within 72h. The effective whole-body absorbed dose for a complete scan after injection of 2×92.5 MBq was between 3 to 4 mSv. The second part of the thesis describes the studies of feasibility and reproducibility of the scintigraphic technique used in humans. Finally, the third part is devoted to the techniques used for data optimization and analysis. Using a method suitable to humans, we have determined an IR-index allowing the discrimination of insulin resistant patients in a mixed population of normally sensitive subjects and IR-patients.

We report the first clinical use of 6DIG and describe an original method of imaging to assess myocardial insulin resistance.

Key-words: Nuclear Imaging - 6DIG - Diabetes - Insulin Resistance - Cardiac Metabolism.