



HAL
open science

Complications des maladies métaboliques et nouvelles approches thérapeutiques : développement d'outils pour des études de suivi longitudinal en imagerie nucléaire

Romain Clerc

► To cite this version:

Romain Clerc. Complications des maladies métaboliques et nouvelles approches thérapeutiques : développement d'outils pour des études de suivi longitudinal en imagerie nucléaire. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAS018 . tel-01693263

HAL Id: tel-01693263

<https://theses.hal.science/tel-01693263>

Submitted on 26 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Romain CLERC

Thèse dirigée par **Catherine GHEZZI, Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes**, et
Codirigée par **Pascale Perret, CR INSERM**

Préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques UMR INSERM 1039**

Dans l'**École Doctorale ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement**

Complications des maladies métaboliques et nouvelles approches thérapeutiques : développement d'outils pour des études de suivi longitudinal en imagerie nucléaire.

Thèse soutenue publiquement le 6 juillet 2017, devant le jury composé de :

Monsieur Jacques GROBER : Rapporteur

MCU, Agrosup Dijon

Madame Sylvie CHALON : Rapporteur

DR INSERM, Université de Tours

Monsieur Gilles KARCHER : Président du jury

PU-PH, CHU de Nancy

Monsieur Olivier MUNDLER

PU-PH, CHU de Marseille

Monsieur Thierry SULPICE

Partenaire Cifre, Toulouse, Physiogenex S.A.S.

Madame Pascale PERRET

CR INSERM, Grenoble

Madame Catherine GHEZZI

PU, Université Grenoble Alpes



Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	3
Introduction générale.....	9
Introduction à l'imagerie nucléaire et ses techniques	11
1 ^{ère} partie : Le 6DIG, un traceur du transport du glucose.....	13
I. Introduction bibliographique.....	14
1) Obésité, syndrome métabolique et diabète de type 2	14
2) Les rôles de l'insuline.....	17
3) Mécanismes de résistance à l'insuline.....	27
4) Méthodes de mesure de la sensibilité à l'insuline	38
5) Méthodes d'étude du transport du glucose	41
6) Modèles animaux.....	46
7) Traitements	50
8) Présentation de l'étude.....	61
II. Matériel et méthodes expérimentales	63
1) Validation de la technique de mesure de l'IR de manière non invasive.....	63
2) Sensibilité de la mesure non invasive de l'index R.....	69
3) Essais d'optimisation de la méthode	71
III. Résultats	73
1) Validation de la technique de mesure de l'IR de manière non invasive en imagerie SPECT 3D.....	73
2) Sensibilité de la mesure non invasive de l'index R.....	76
3) Essai d'optimisation de la méthode	77
IV. Discussion	82
1) Validation de la méthode en imagerie SPECT	82
2) Sensibilité de la méthode.....	84
3) Essais d'optimisation.....	87

4) Conclusion	92
2ème partie : Stéato-hépatopathies et traceur de l'inflammation.....	93
I. Introduction bibliographique.....	94
1) Le foie.....	94
2) Les stéato-hépatopathies non alcooliques.....	96
3) Modèles animaux.....	110
4) Outils diagnostiques	115
5) Traitements	139
6) cAbVCAM1-5, traceur de l'inflammation	147
7) Présentation de l'étude.....	158
II. Matériel et méthodes expérimentales	159
1) Méthode proposée.....	159
2) Sensibilité de la méthode proposée	165
III. Résultats	167
1) Méthode proposée.....	167
2) Sensibilité de la méthode proposée	177
IV. Discussion	184
Conclusion générale	192
Références bibliographiques	193

Abréviations

3OMG : 3-O-méthyl glucose

6DIG : 6-déoxy-6-iodo-D-glucose

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis inducing Factor

ALT : ou ALAT, Alanine Aminotransférase

ARFI : Acoustic Radiation Force Impulse Imaging

AST : ou ASAT, Aspartate Aminotransférase

AUROC : Area Under Receiver Operating Characteristic

CART : Cocaine and amphetamine regulated transcript

CCL2 : Chemokine Ligand 2, aussi MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

CCL4 : Chemokine Ligand 4

CCR2 : Chemokine Receptor type 2

CDC : Centers for Disease Control and prevention

CDCA : acide chénodésoxycholique (ChenoDeoxyCholic Acid)

Clec4f : C-type lectin domain family 4, member F

CNR : Clinical Research Network

CPT1 : Carnityl PalmitoylTransferase 1

CREB : C-AMP Response Element Binding protein

CSI : Chemical Shift Imaging

CT : Computed Tomography

DAG : DiAcylGlycérol ou diglycéride

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

EGIR : European Group for the study of Insulin Resistance

ELF : European Liver Fibrosis test

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation

Fab : Fragment antigen Binding

FAS : Fatty Acid Synthase

FDA : Food and Drug Administration

FDG : FluoroDésoxyGlucose

FLINT : The Farnesoid X Receptor (FXR) Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment

FSI : Frequency Shift Imaging

FXR : Farnesoid X Receptor

G6P : Glucose 6 Phosphatase ou Glucose 6 Phosphate

GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein, aussi PPP1R15A : Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 15A

γ-GT : gammaglutamyl-transférase

GIR : Glucose Infusion Rate

GLP1 : Glucagon-Like Peptide 1

GPAT : Glycérol-3-Phosphate acyltransferase

HAS : Haute Autorité de Santé

HbA1c : Fraction A1c de l'hémoglobine, Hemoglobine Glyquée

Hcabs : Heavy chain antibodies

HDL : High Density Lipoprotein

HES : Hématoxyline Éosine Safran

HFD : High Fat Diet

HMF : Hepatic MyoFibroblast

HOMA : Homeostasis Model Assessment of insulin resistance

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HSC : Hepatic Stellate Cell

HSL : Hormone Sensitive Lipase

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1

IDF : International Diabetes Federation

IgG : Immunoglobuline G

IKK- β : Inhibitor of nuclear factor kappa-B

IL1 β : Interleukin 1 beta

IL-6 : Interleukin 6

IMC : Indice de Masse Corporelle, aussi BMI : Body Mass Index

IR : Insulinorésistance

IRM : Imagerie par résonance magnétique, aussi MRI : Magnetic Resonance Imaging

IRS : Insulin Receptor Substrate

JNK : c-Jun N-terminal kinases

KC : Kupffer cell

LPS : LipoPolySaccharide

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MCD : Methionine and Choline Deficient diet

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1, aussi CCL2 : Chemokine Ligand 2

MIBI : m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile

MRI : Magnetic Resonance Imaging, aussi **IRM** : Imagerie par résonance magnétique

MRS : Magnetic Resonance Spectrography

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic SteatoHepatitis

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NO : Nitric Oxide, monoxyde d'azote

OCA : Obeticholic Acid

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test

OMS : Organisation Mondiale pour la santé

ORO : Oil Red O

PAL : Phosphatase ALcaline

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PDFF : Proton Density Fat Fraction

PEPCK : PhosphoÉnolPyruvate CarboxyKinase

PET : Positron Emission Tomography

PI3K : PhosphoInositide 3-kinase

PKB : Protein Kinase B

PKC theta : Protein Kinase C-theta

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

QUICKI : QUantitative Insulin sensitivity Check Index

RE : Réticulum endoplasmique

REGENERATE : Randomized Global Phase 3 Study to Evaluate the Impact on NASH With Fibrosis of Obeticholic Acid Treatment

ROS : Reactive Oxygen Species

SAAM : Simulation Analysis And Modeling

SCD1 : Stearoyl-CoA Desaturase

scFv : single chain variable fragment

SGLT2 : Sodium/Glucose cotransporter 2

SHC : Src Homologous and Collagen protein

SNS : Système Nerveux Sympathique

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein

SWI : Shear Wave Imaging

TG : Triglycéride

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TLR4 : Toll Like Receptor 4

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand

TZD : Tiazolidinédione

UDCA : UrsoDeoxyCholic Acid

UH : Unité Hounsfield

UPR : Unfold protein Response

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VCTE : Vibration Controlled Transient Elastography

VD : Ventricule Droit

VG : Ventricule Gauche

VLA-4 : Very Late Antigen-4

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

VOCs : Volatile Organic Compounds

VOI : Volume Of Interest

Vsig4 : V-set and Ig domain containing 4

XBP1 : X-Box Protein 1

ZDF : Zucker Diabetic Fatty

Introduction générale

Le syndrome métabolique est une association de plusieurs troubles métaboliques tels que l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hypertension artérielle, des taux élevés de triglycérides, de cholestérol et de glucose sanguins. Ces anomalies métaboliques sont de réels facteurs de risques de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires.

L'apparition d'une résistance à l'insuline semble être l'un des éléments clés des pathologies métaboliques (Mlinar *et al.*, 2007). Elle précède le développement du diabète de type 2 et est présente chez de nombreuses personnes obèses. Elle multiplie par 8 le risque de diabète, par 2 le risque d'hypertension et par 3 le risque de maladie cardiovasculaire (Zavaroni *et al.*, 1999). La présence d'une résistance à l'insuline à un stade précoce de ces pathologies majeures de l'âge adulte en fait un problème majeur de santé publique. Sa prévalence est difficile à apprécier et elle est probablement sous-estimée, d'une part car elle se situe en amont des signes cliniques qui conduisent le patient chez le médecin, et d'autre part car il n'existe pas de technique de mesure simple et robuste de l'IR utilisable en routine clinique. Or, il est bien établi que la sensibilité à l'insuline pourrait être améliorée par des mesures hygiéno-diététiques et par des traitements insulinosensibilisateurs. Le dépistage précoce de l'insulinorésistance et l'étude des mécanismes qui la soutiennent sont donc essentiels en termes de santé publique (Radziuk, 2000).

Le syndrome métabolique se caractérise également par des atteintes hépatiques, les stéato-hépatopathies non alcooliques (ou NAFLD pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Les NAFLD sont étroitement liées à l'obésité et à l'insulinorésistance, dont la prévalence n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies, et représentent ainsi la première cause des maladies chroniques du foie (Younossi *et al.*, 2015, 2011). Les NAFLD regroupent un large spectre de pathologies de gravités graduelles allant de la simple stéatose hépatique à la fibrose, la cirrhose et même l'hépatocarcinome. On admet qu'aujourd'hui, 25% de la population mondiale serait touchée par les NAFLD (Younossi *et al.*, 2015). Il est probable que cette prévalence soit sous-estimée compte tenu du manque d'outils

diagnostiques, particulièrement pour les premiers stades asymptomatiques de la maladie. Si à l'heure actuelle il n'y a aucun véritable traitement spécifique des stéatoses, utilisable en clinique, différentes approches thérapeutiques sont à l'étude et des moyens d'interventions préventifs de l'évolution de la maladie existent.

L'insulinorésistance et les stéatohépatopathies apparaissent donc comme deux composantes importantes du syndrome métabolique, présentant chacune une phase silencieuse, et le développement de techniques diagnostiques précoces, présentent un intérêt majeur. Dans ce contexte, l'imagerie nucléaire, technique d'imagerie médicale qui étudie des processus moléculaires, biologiques et biochimiques *in vivo*, semble particulièrement adaptée.

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent le développement de nouvelles techniques de diagnostic et de suivi de l'insulinorésistance et des NAFLD en imagerie SPECT. Pour cela ces travaux ont utilisé deux traceurs originaux développés au sein de l'unité mixte de recherche INSERM U1039 "Radiopharmaceutiques Biocliniques" dans laquelle a été réalisé ce projet.

La mesure de l'insulinorésistance a été réalisée avec un traceur pur du transport du glucose, le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG), et fait l'objet de la première partie de ce travail.

La mesure de l'inflammation hépatique a été réalisée avec un marqueur de l'inflammation, un ligand de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), marqué au technétium 99m cAb-VCAM1-5, et fait l'objet de la seconde partie du travail.

La mise au point de méthodes d'évaluation et de suivi longitudinal de la résistance à l'insuline et de l'inflammation hépatique permettrait de proposer de nouvelles méthodes de diagnostic précoce en clinique mais également des outils pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques en recherche préclinique.

Introduction à l'imagerie nucléaire et ses techniques

L'insulinorésistance et les stéatohépatopathies sont deux composantes importantes du syndrome métabolique présentant une forte prévalence et nécessitant de nouvelles techniques diagnostiques. Dans ce contexte, l'imagerie nucléaire, technique d'imagerie médicale qui étudie des processus biologiques et biochimiques *in vivo*, semble particulièrement adaptée. Cette technique d'imagerie se base sur l'utilisation d'un traceur, spécifique d'une molécule ou d'une fonction, et marqué par un radioisotope permettant sa détection externe. Les radiotraceurs varient, soit par la nature du vecteur (anticorps, peptides, etc...) soit par le radioisotope utilisé pour les marquer.

Dans le cas de l'imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography, ou TEMP en français (Tomographie d'Emission Mono Photonique)), le traceur porte un radioisotope émetteur de rayonnements gamma. Après l'injection de ce radiotraceur dans l'organisme il est possible de retracer sa biodistribution grâce à une caméra dédiée. Les caméras SPECT permettent l'obtention d'images en trois dimensions de la biodistribution du radiotraceur. Pour cela la caméra dispose de détecteurs, généralement 4, disposés sur un anneau tournant autour de la source. L'acquisition d'images sous différentes incidences angulaires, ou projections, permet la reconstruction d'une image tomographique. Plus les projections sont nombreuses et leur durée importante, plus le nombre de rayonnements captés par les détecteurs sera important, plus la reconstruction spatiale sera précise. Généralement l'imagerie SPECT est couplée à une imagerie anatomique obtenue grâce à un scanner à rayons X présent au sein de la caméra SPECT. L'association de l'imagerie fonctionnelle et anatomique permet alors de localiser précisément la distribution du traceur au sein des organes.

Il est également possible de réaliser des scintigraphies planaires. L'image est obtenue grâce à un seul détecteur immobile et représente ainsi l'intégralité du signal dans la direction de l'unique projection. L'activité de chaque pixel est alors calculée depuis la somme de tous les événements détectés sur une ligne de vue perpendiculaire au détecteur. La reconstruction d'une image bidimensionnelle

nécessite des statistiques de comptage inférieures à celles nécessaires à la reconstruction d'une image tridimensionnelle. En imagerie planaire les temps d'acquisition sont ainsi réduits. Il est alors possible de réaliser une succession rapide d'acquisitions permettant l'obtention d'une image dynamique représentant la distribution du traceur au cours du temps. Toutefois la localisation du traceur est bien moins bonne qu'avec une modalité d'imagerie SPECT 3D.

Parmi les radioisotopes utilisés en imagerie SPECT, le technétium 99 métastable (^{99m}Tc) est sans doute le plus utilisé. Il s'agit d'un émetteur pur de rayonnement γ de 141 keV et de demi-vie radioactive de 6,02 heures. Il est produit lors de la désintégration du noyau radioactif précurseur de molybdène 99 (^{99}Mo), d'une période radioactive de 67h. Cette production peut être réalisée grâce à des générateurs commercialisés. La disponibilité du ^{99m}Tc a permis le développement de nombreux radiotraceurs disponibles en pratique clinique. Les autres radioisotopes les plus fréquemment utilisés en imagerie sont l'iode 123 et le thallium 201 (Tableau 1). Aujourd'hui la SPECT est utilisée quotidiennement dans les services de médecine nucléaire et est devenue un outil diagnostique incontournable, notamment dans l'évaluation de la perfusion myocardique ou cérébrale.

Radiopharmaceutique	Radioisotope	Émission et demi-vie	Utilisation
Phosphonates	^{99m}Tc	R γ : 141 keV 6,02 h	Scintigraphie osseuse
Tétrofosmine, Sestamibi	^{99m}Tc	R γ : 141 keV 6,02 h	Perfusion myocardique
Examétazine ou HMPAO	^{99m}Tc	R γ : 141 keV 6,02 h	Perfusion cérébrale
Métaiodobenzylguanidine ou MIBG	^{123}I	R γ : 159 keV 13,2 h	Détection de tumeurs neuroendocrines ou neurologiques
Thallium	^{201}Tl	R γ : 167 keV 3 jours	Perfusion myocardique

Tableau 1 : Exemples de radiopharmaceutiques fréquemment utilisés en imagerie SPECT clinique.

1^{ère} partie : Le 6DIG, un traceur du transport du glucose.

I. Introduction bibliographique

1) Obésité, syndrome métabolique et diabète de type 2

L'obésité est devenue une pandémie mondiale ces dernières décennies, avec 37,9% d'adultes obèses aux États-Unis et 70,7% d'adultes en surpoids (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). De plus, la prévalence de cette maladie n'est plus réservée aux seuls pays occidentaux avec notamment une importante augmentation de l'obésité dans les pays arabophones (Badran and Laher, 2011), mais aussi en Inde (Hoque *et al.*, 2014). L'obésité est le résultat d'une mauvaise balance entre l'apport calorique et la dépense énergétique, conduisant à l'accumulation de l'excès énergétique sous forme de tissu adipeux blanc. L'obésité va alors prédisposer au développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et à leurs complications, telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles du sommeil et certains cancers (Kopelman, 2000). De plus l'obésité représente un coût important pour la société. Pour exemple, aux États-Unis en 2005, environ 16,5% du budget médical national a été dépensé pour le traitement de l'obésité et de ses complications, soit environ 168,4 milliard de dollars (Cawley and Meyerhoefer, 2010).

Le développement du tissu adipeux, en conséquence d'une balance énergétique positive prolongée, est associé avec le développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2, de dyslipidémies, et de troubles de la coagulation. Ensemble ces désordres sont des caractéristiques du syndrome métabolique, et sont tous des facteurs de risque indépendants pour les maladies cardiovasculaires (Figure 1) (Boden, 2011).

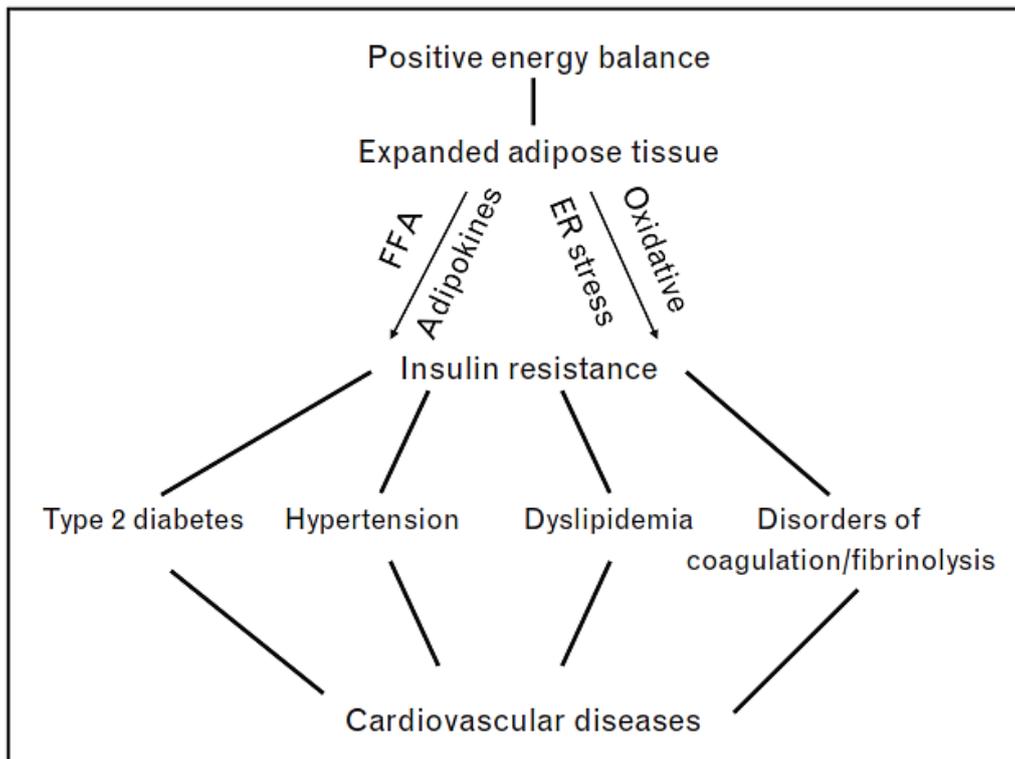


Figure 1 : Relation entre balance d'énergie positive, développement du tissu adipeux, résistance à l'insuline et maladies cardiovasculaires (Boden, 2011).

Les définitions du syndrome métabolique ont été nombreuses et beaucoup révisées dans le temps. Elles varient selon les différents organismes de santé s'y intéressant. Parmi ces derniers se retrouvent l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) : l'EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance), le NCEP-ATP III (National Cholesterol Education / Program-Adult Treatment Panel III) ou encore l'IDF (International Diabetes Federation). Si leurs définitions diffèrent par les seuils des critères pris en compte, des tentatives d'harmonisation ont toutefois eu lieu. De manière générale le syndrome métabolique est admis quand 3 des 5 critères suivants sont retrouvés (Alberti *et al.*, 2009) :

- Tour de taille élevé (les valeurs dépendent des populations étudiées).
- Triglycérides dans le sang élevés (> 150 mg/dL)
- HDL-C dans le sang réduit (< 40 ou < 50 mg/dL, femmes ou hommes)
- Pression artérielle élevée (systolique > 130 et/ou diastolique < 85 mm Hg)
- Glycémie à jeun élevée (> 100 mg/dL)

La résistance à l'insuline est un élément central du syndrome métabolique, perturbant de nombreux mécanismes d'homéostasie. L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. De nombreuses pathologies sont associées à des anomalies du métabolisme du glucose ou à des perturbations de son transport, comme par exemple le diabète de type 2 ou encore les ischémies myocardique ou cérébrale (Cefalu, 2008).

Afin de compenser cette résistance, la sécrétion d'insuline est augmentée. Toutefois cette compensation est limitée dans le temps et lorsque sa production n'est plus suffisante pour contrôler la glycémie, on parle alors de diabète. Le diabète de type 2 est ainsi caractérisé à la fois par une résistance à l'insuline et par un défaut de sa sécrétion. Il est diagnostiqué par une hyperglycémie à jeun et est également appelé diabète non insulino-dépendant, par opposition au diabète de type 1, insulino-dépendant, caractérisé par une destruction auto-immune des cellules produisant l'insuline. La prévalence du diabète est en nette augmentation dans les pays industrialisés et les nombreuses complications qui lui sont associées en font un véritable problème de santé publique (Radziuk, 2000). Les critères définissant le syndrome métabolique, l'obésité, la résistance à l'insuline et la dyslipidémie sont prédictifs de l'apparition du diabète de type 2 dans environ 80% des cas, expliquant ainsi l'augmentation de sa prévalence (Lebovitz, 1999). Selon l'OMS, en 2014, 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète, contre 108 millions en 1980 (Rapport mondial sur le diabète, OMS, 2016). La prévalence sur cette période a doublé, passant de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014. En 2012 le diabète a causé 1,5 millions de décès et 2,2 millions de plus par l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires notamment. En effet l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance rénale, l'amputation des jambes, la perte de vision et des liaisons nerveuses font partie des complications retrouvées dans les stades ultimes du diabète.

La gravité des complications liées au diabète et l'importance prédictive de l'IR dans leur évolution justifie le développement de tests diagnostiques et de suivi de l'IR en pratique clinique.

2) Les rôles de l'insuline

1. L'insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans, des cellules endocrines du pancréas regroupées en amas. L'insuline a des fonctions régulatrices dans les métabolismes glucidique, lipidique et protéique, notamment en régulant l'absorption du glucose du sang vers le tissu adipeux et les muscles squelettiques et cardiaque. C'est la seule hormone capable de faire diminuer la glycémie. L'insuline agit également de manière importante dans le foie où elle régule le stockage et la production de glucose endogène. L'insuline est ainsi une hormone pléiotrope (Figure 2) (Capeau, 2003).

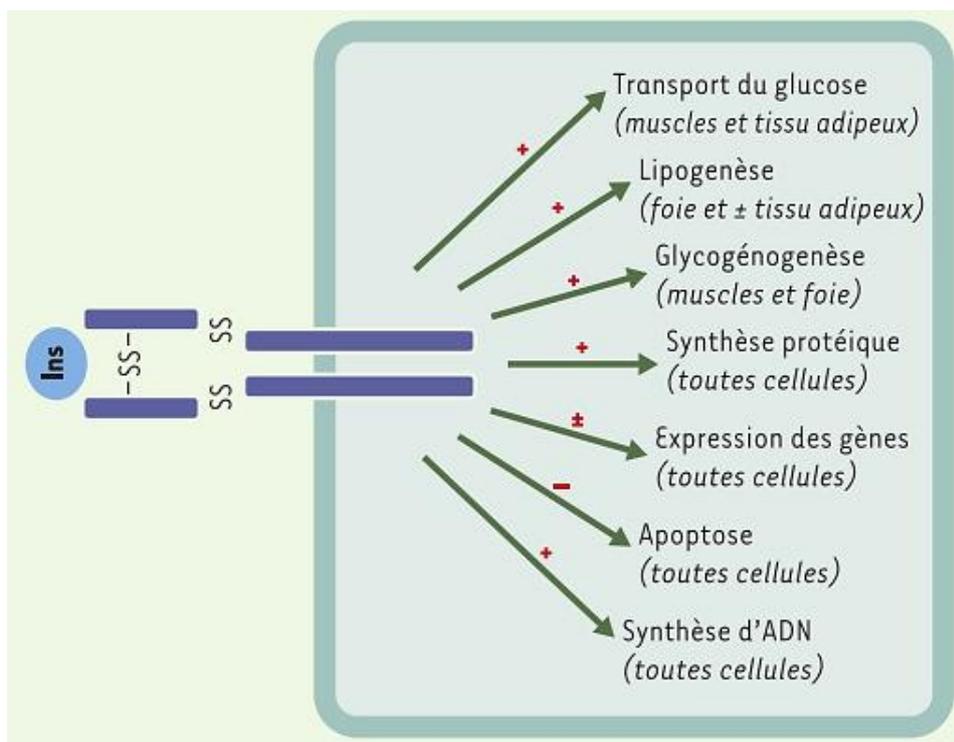
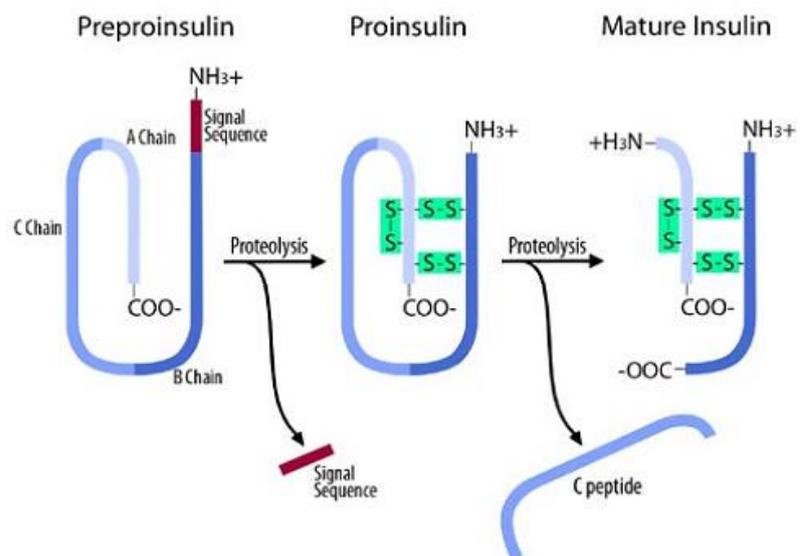


Figure 2 : Effets pléiotropes de l'insuline (Capeau, 2003). L'insuline exerce différents effets dans de nombreux tissus en se fixant à son récepteur spécifique.

Production

L'insuline est codée par le gène INS permettant la traduction d'une chaîne de 101 acides aminés, appelée préproinsuline et contenant un peptide signal et trois courtes chaînes (A, B et C) (Figure 3) (Aiysha Thompson, 2013). Le peptide signal est ensuite clivé dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux, formant ainsi la proinsuline, constituée de 86 acides aminés. La proinsuline est alors repliée, les chaînes A et B sont reliées par deux ponts disulfures et un troisième pont est créé sur la chaîne B. Enfin la chaîne C, appelée aussi peptide C, est séparée du reste de la structure libérant ainsi l'insuline mature, constituée de 51 acides aminés. L'insuline est stockée dans les cellules β à l'intérieur de vésicules, jusqu'à sa libération.

Figure 3 : Maturation de la préproinsuline. La séquence signal est dans un premier temps retirée de l'extrémité N-terminale de la préproinsuline par des protéases. Puis des ponts disulfures sont créés pour former la proinsuline. Enfin le clivage du peptide-C permet d'obtenir l'insuline mature (Aiysha Thompson, 2013).



Sécrétion

Les cellules des îlots de Langerhans sont baignées dans un liquide interstitiel communiquant avec des capillaires sanguins. Le glucose circulant parvient ainsi aux cellules β , où il y est capté par les transporteurs du glucose GLUT2, non saturables aux concentrations de glucose sanguin physiologiques. Ainsi la captation du glucose est proportionnelle à la glycémie, permettant aux cellules β de fonctionner comme des senseurs de glucose, ajustant leur production et leur sécrétion d'insuline à la glycémie. Le glucose est métabolisé dans la cellule β , produisant ainsi de l'ATP, se liant aux récepteurs aux sulfonylurées et causant la fermeture du canal potassique ATP-dépendant associé. Le potentiel de

membrane s'en trouve augmenté, activant les canaux calciques voltage-dépendant. La dépolarisation membranaire résultante active les canaux calciques voltage-dépendant, et l'entrée de calcium dans la cellule déclenche la fusion et l'exocytose des vésicules d'insuline avec la membrane de la cellule beta, libérant l'insuline dans la circulation sanguine *via* le liquide interstitiel (Figure 4) (Palmer, 2014).

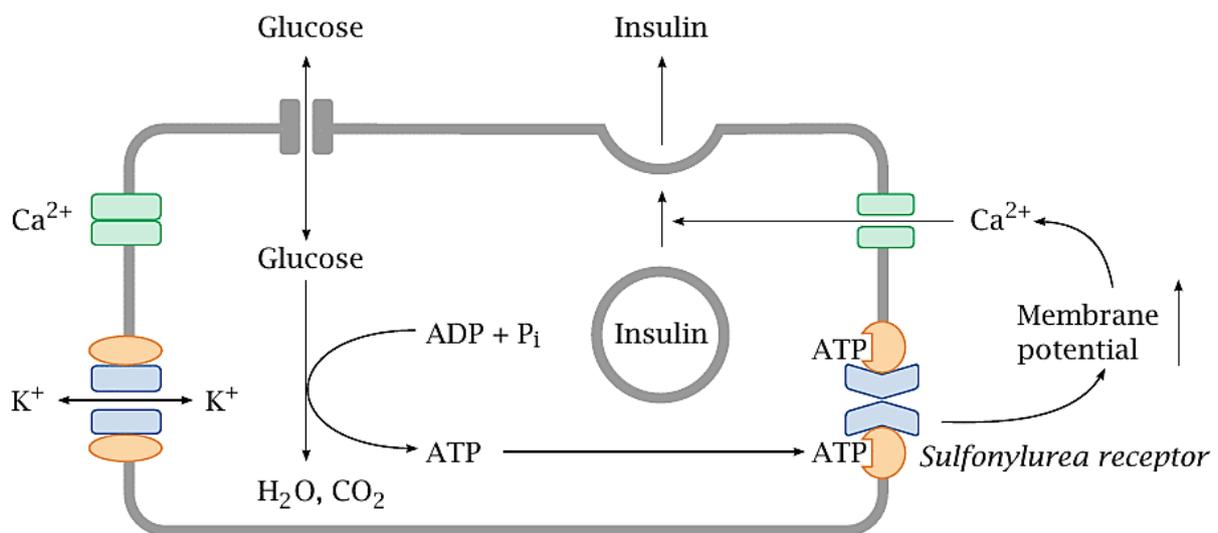


Figure 4 : Mécanismes de sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique (Palmer, 2014). L'augmentation de la glycémie entraîne une augmentation du métabolisme glucidique et de la production d'ATP qui va activer les récepteurs aux sulfonylurées causant la fermeture des canaux potassiques auxquels ils sont associés. La modification du potentiel de membrane ainsi entraînée va permettre l'entrée du calcium dans la cellule nécessaire à l'exocytose des vésicules d'insuline.

La sécrétion de l'insuline peut se distinguer en deux phases. Une partie des vésicules de sécrétion sont accolées à la membrane de la cellule. Ainsi en cas de besoin ces vésicules sont immédiatement mobilisables et sont responsables de la première phase de sécrétion de l'insuline. Une fois que le stock de vésicules accolées à la membrane est épuisé, il est nécessaire de recruter de nouvelles vésicules. Leur exocytose représentera la seconde phase de sécrétion d'insuline.

Récepteurs à l'insuline

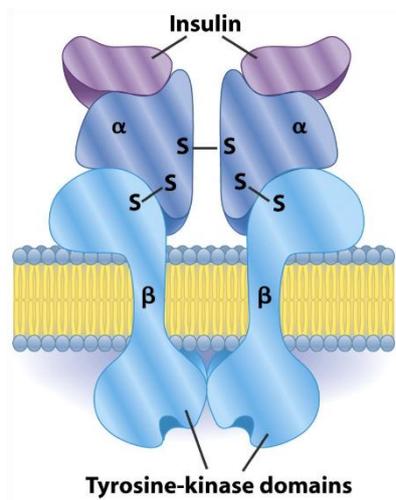


Figure 5 : Le récepteur à l'insuline (Moran *et al.*, 2011).

Les récepteurs à l'insuline se retrouvent sur tous les organes sensibles à l'insuline. La plus grande densité de récepteurs se retrouve sur le foie, plus de la moitié de l'insuline produite par le pancréas est même captée par ce dernier (Watanabe *et al.*, 1998). Le récepteur à l'insuline fait partie de la superfamille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Le récepteur à l'insuline est transmembranaire, et possède deux chaînes α extracellulaires, reliées à deux chaînes β transmembranaires par des ponts disulfures (Figure 5) (Moran *et al.*, 2011). Les sous-

unités β possèdent un domaine intracellulaire catalytique tyrosine kinase. En l'absence d'insuline les sous-unités α inhibent l'activité des sous-unités β en les maintenant dans une conformation permettant l'occultation du site tyrosine kinase. En présence d'insuline les deux sous-unités β se rapprochent, permettant l'activation du site tyrosine kinase par autophosphorylation. Le récepteur ainsi phosphorylé pourra à son tour phosphoryler d'autres résidus tyrosine de la sous-unité β ainsi que des protéines substrats. Ces protéines régulatrices interagiront ensuite en aval avec les protéines impliquées dans les différentes cascades de signalisation.

Signalisation de l'insuline

La transmission du signal depuis le récepteur à l'insuline implique de nombreux acteurs intracellulaires dont les membres de la famille des IRS (Insulin Receptor Substrates) ou de la famille des protéines adaptatrices SHC (Src Homologous and Collagen protein). Chez l'homme IRS1 et IRS2 sont les plus importants et ont un rôle complémentaire dans les fonctions métaboliques de la signalisation à l'insuline (Hanke and Mann, 2009).

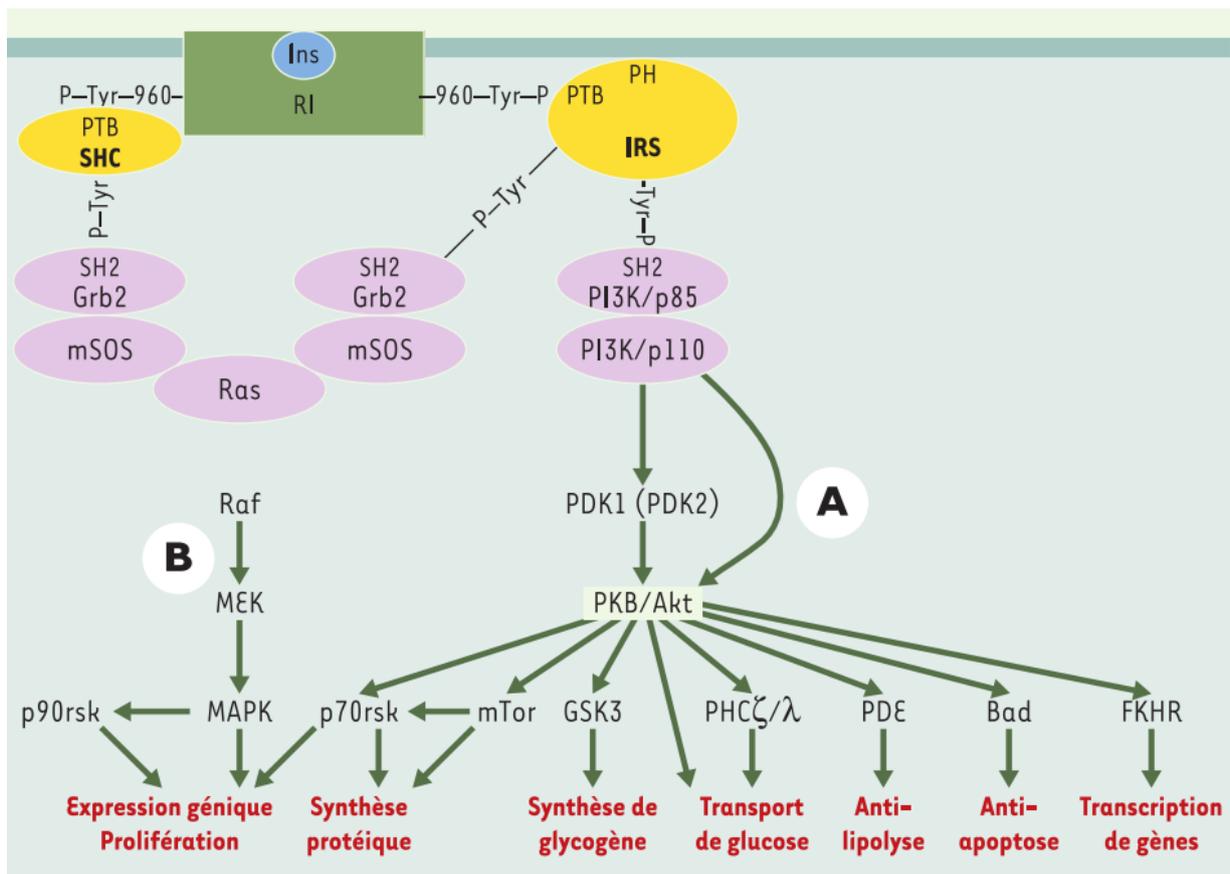


Figure 6 : Principales voies de signalisation par l'insuline : les voies PI3K (A) et des MAPK (B) (Capeau, 2003).

La signalisation à l'insuline peut être divisée en deux voies distinctes. La voie des MAPK (Mitogen Associated Protein kinases) et la voie de la PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase) (Figure 6) (Capeau, 2003). Les protéines IRS et SHC interagissent avec le domaine à activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline, permettant ainsi à ce dernier de phosphoryler des résidus tyrosine spécifiques sur ces protéines. La cascade de signalisation ainsi lancée va aboutir au recrutement de différentes protéines relais. La voie de la PI3k va par exemple

conduire à l'activation de kinases telles que la protéine kinase B (PKB ou Akt), activant différents relais intracellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'insuline (Figure 6) (Capeau, 2003). La voie des MAPK quant à elle passe par l'activation de la protéine Ras jusqu'à la MAPK impliquée principalement dans la prolifération cellulaire.

Après l'autophosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et la transmission de l'information aux acteurs intracellulaires, le complexe ligand-récepteur est internalisé dans des puits à clathrine, conduisant à son endocytose. Des lysosomes le prennent alors en charge et l'insuline est dégradée, les récepteurs peuvent alors être recyclés et réintégrés dans la membrane. Ce processus permet non seulement un recyclage des récepteurs mais aussi une régulation de leur présence et de leur distribution à la surface de la cellule.

2. Actions métaboliques de l'insuline

L'insuline a un rôle central dans le maintien de l'homéostasie glucidique. L'augmentation de la glycémie, après un apport alimentaire par exemple, va déclencher la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas. L'action de l'insuline sera alors dirigée vers la diminution de la glycémie et l'augmentation des mécanismes de stockage du glucose (Figure 7) (Samuel and Shulman, 2012).

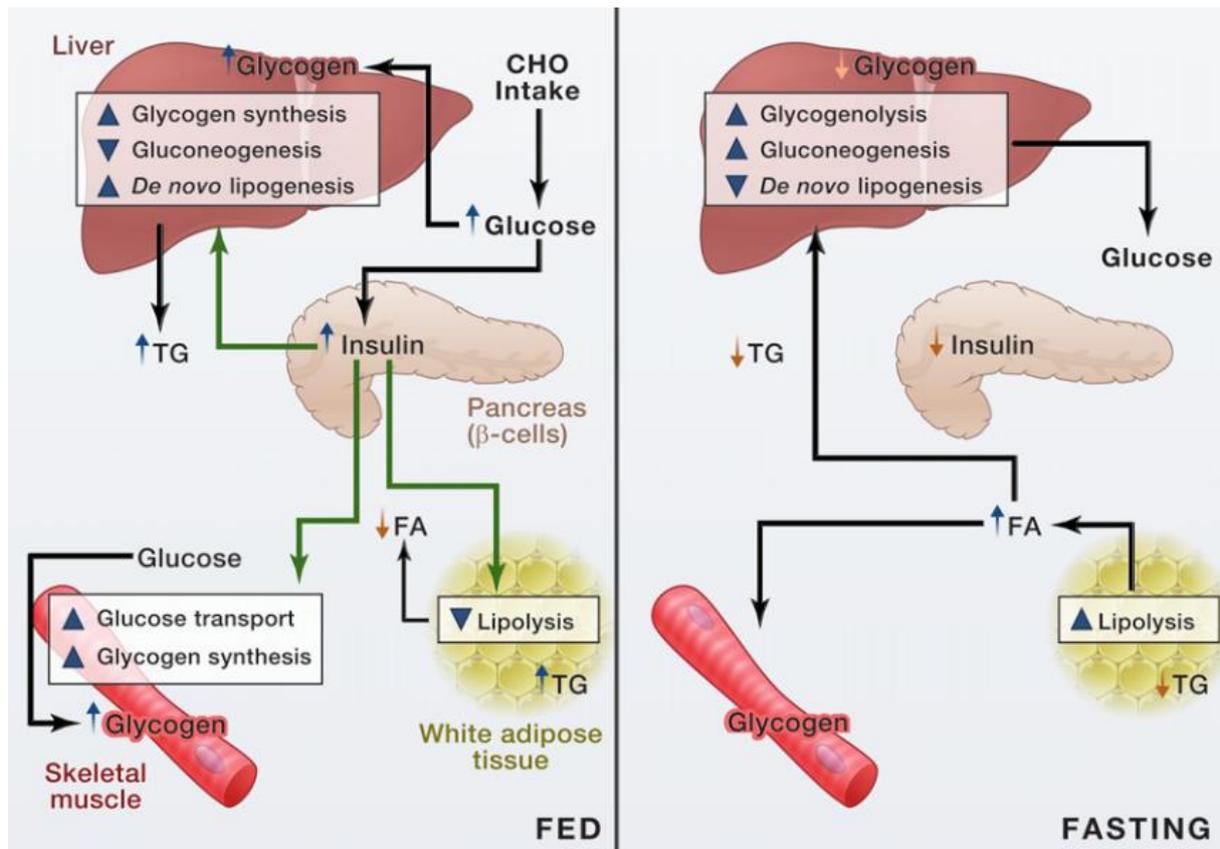


Figure 7 : Modes d'action de l'insuline sur ses tissus cibles (Samuel and Shulman, 2012). À gauche, après ingestion d'un repas riche en carbohydrates (CHO), l'augmentation de la glycémie stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas permettant l'augmentation du stockage des calories sous forme de glycogène dans les muscles et le foie et de triglycérides dans le tissu adipeux blanc. Le transport du glucose est augmenté dans les muscles. Dans le foie, la lipogenèse *de novo* est augmentée et les lipides ainsi obtenus sont exportés et stockés dans le tissu adipeux ; en revanche la néoglucogenèse est inhibée. Par ailleurs, l'insuline diminue la lipolyse dans le tissu adipeux, réduisant ainsi la quantité d'acides gras circulants et favorisant l'utilisation des glucides. À droite, en période de jeun, la sécrétion d'insuline est diminuée et les calories sont libérées de leurs lieux de stockage. La lipolyse est augmentée dans le tissu adipeux et la production hépatique de glucose à partir du glycogène est augmentée.

Transport du glucose

L'insuline permet d'augmenter le transport du glucose dans les muscles et le tissu adipeux. Ce transport est réalisé par des protéines transmembranaires, les GLUT. Les GLUT sont une superfamille de transporteurs membranaires permettant une diffusion facilitée de leur substrat, sans dépense d'énergie. La famille des GLUT humains compte 14 membres, impliqués dans le transport de différents hexoses. La plupart des cellules du corps humain expriment au moins un type de GLUT, les sucres représentant une source d'énergie importante (Figure

8) (Mueckler and Thorens, 2013). GLUT1 et GLUT3 sont les plus représentés, ils se retrouvent majoritairement sur les cellules sanguines et cérébrales. GLUT2 est quant à lui présent dans le foie et les cellules β -pancréatiques. Il présente la particularité d'avoir une grande capacité de transport, avec un Km compris entre 15-20 mM, contrairement aux autres GLUT ayant un Km compris entre 1 et 5mM. C'est cette particularité qui permet aux cellules β d'assurer la fonction de senseur au glucose.

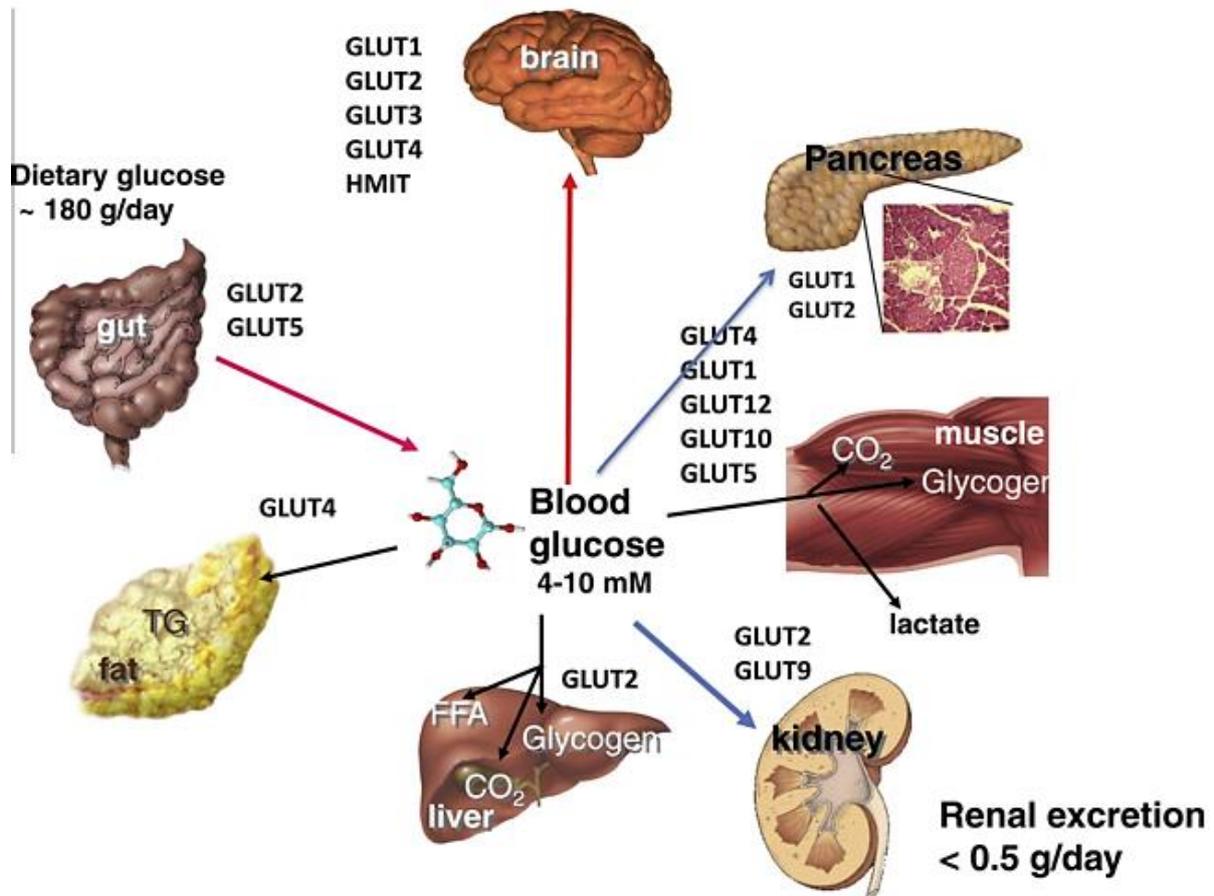


Figure 8 : Les différents isoformes de GLUTs impliqués dans le maintien de l'homéostasie glucidique (Mueckler and Thorens, 2013).

Toutefois un seul type de GLUT, GLUT4, présente la particularité d'avoir une activité stimulée par l'insuline. Depuis sa caractérisation à la fin des années 1980 (James *et al.*, 1988), GLUT4 a été le transporteur le plus étudié. Ces transporteurs sont présents dans les muscles squelettiques, le cœur et les adipocytes, stockés dans leur quasi-totalité dans des vésicules cytoplasmiques à l'état basal (Zorzano *et al.*, 1989). De manière dose dépendante, l'insuline va stimuler la translocation de ces vésicules vers la membrane plasmique de la cellule

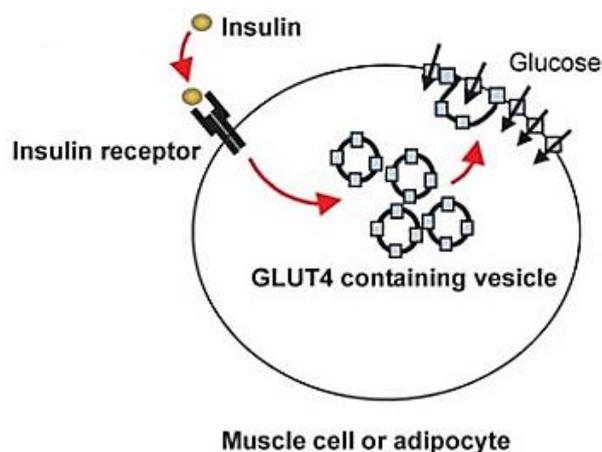


Figure 9 : Augmentation du transport du glucose en réponse à la fixation de l'insuline sur son récepteur dans les tissus insulinosensibles (Uldry and Thorens, 2004).

(Figure 9) (Uldry and Thorens, 2004). Plus le nombre de transporteurs présents dans la membrane sera élevé, plus l'entrée de glucose dans la cellule sera importante. De plus il existe un recyclage permanent des GLUT4 de la membrane vers leur lieu de stockage, par un mécanisme d'endocytose, *via* des vésicules à clathrine. L'insuline augmente non seulement le transport des vésicules de GLUT4 vers la membrane mais

également leur recyclage depuis cette dernière. Leur *turnover* est ainsi augmenté et donne au flux de transporteurs une forme pulsatile rapide (Coster *et al.*, 2004).

Modulation du métabolisme glucidique

L'insuline agit sur le métabolisme glucidique, principalement dans le foie et les muscles squelettiques, principaux consommateurs de glucose en période post-prandiale. Dans le foie, l'insuline stimule la transformation du glucose en lipides et en glycogène *via* l'activation des enzymes impliquées dans ces deux voies de synthèse. Une stimulation suffisante à l'insuline permet également de supprimer la production *de novo* de glucose par le foie. Dans le muscle squelettique, le cœur et le tissu adipeux, l'insuline augmente le transport du glucose et sa phosphorylation. Et comme dans le foie, l'insuline stimule la synthèse de glycogène dans le muscle.

Modulation du métabolisme lipidique

L'insuline a une action anti lipolytique forte sur le tissu adipeux. Elle augmente la captation et le stockage des acides gras libres circulants et diminue la lipolyse par les adipocytes. Dans le foie l'insuline promeut la lipogenèse *de novo*, augmentant ainsi l'export des triglycérides produits par le foie vers les tissus périphériques (Samuel and Shulman, 2012).

3. Actions vasculaires de l'insuline

L'insuline a également de nombreux effets sur le système cardiovasculaire. Elle a un rôle vasodilatateur *via* l'augmentation de la production de NO par l'eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase). De plus l'insuline permet de recruter des capillaires sanguins dans le muscle squelettique. Mais l'insuline peut également avoir un effet vasoconstricteur en activant le système nerveux sympathique, lui-même activateur de la production de l'endothéline 1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur. Cette modulation de l'hémodynamique concerne à la fois les muscles squelettiques mais aussi le myocarde. L'augmentation du flux sanguin myocardique favorise l'apport en oxygène aux cardiomyocytes, qui, couplé à l'augmentation du transport du glucose, permet d'augmenter la fonction myocardique (Figure 10) (Muniyappa *et al.*, 2007).

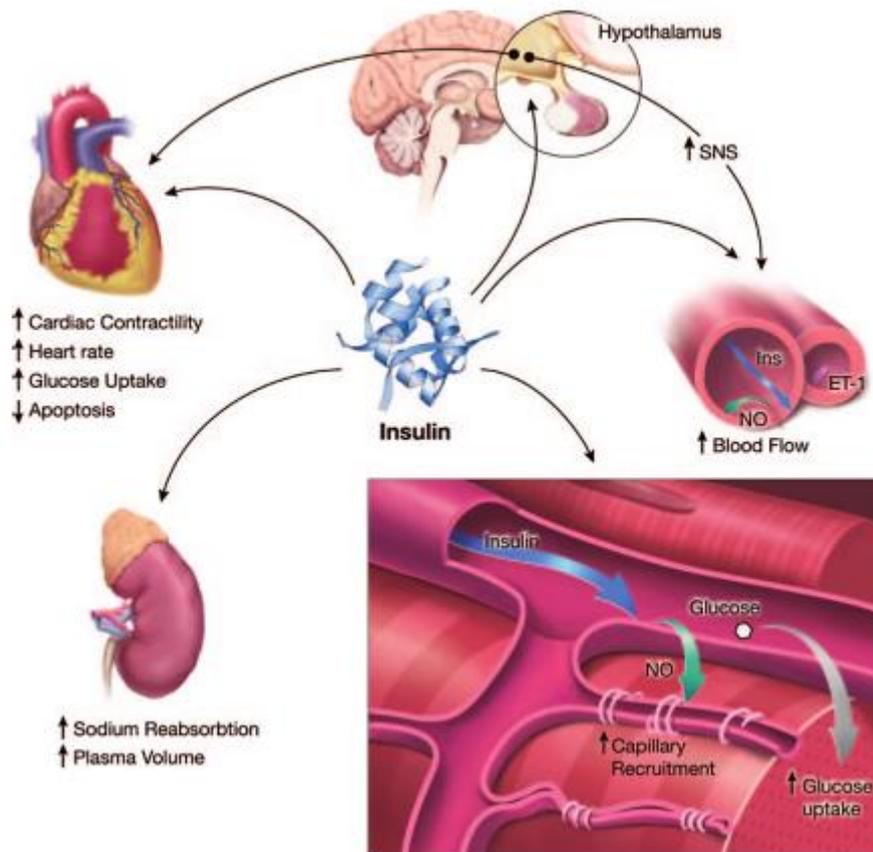


Figure 10 : Cibles et actions cardiovasculaires de l'insuline (Muniyappa *et al.*, 2007). L'insuline agit sur le flux sanguin et améliore la contractilité cardiaque.

Les actions de l'insuline sont déterminantes pour le maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire, les maladies cardiovasculaires restant la première cause de mortalité chez les patients diabétiques de type 2 (Younk *et al.*, 2014). La résistance à l'insuline est directement impliquée dans les arrêts cardiaques, chez les patients obèses et insulino-résistants. De nombreuses études s'intéressent à la modulation de la thérapeutique insulinique pour en diminuer les conséquences mortelles (Riehle and Abel, 2016).

3) Mécanismes de résistance à l'insuline

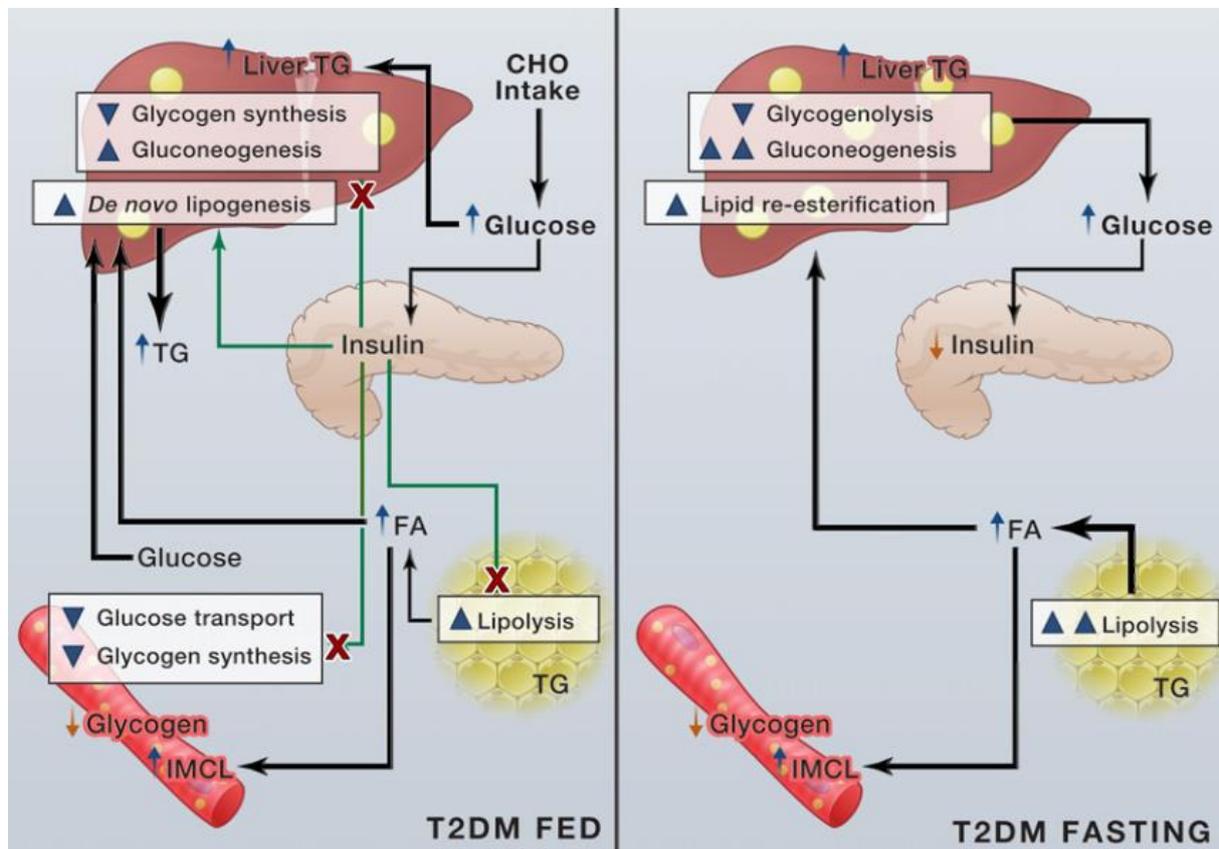


Figure 11 : Défaits d'action de l'insuline dans le diabète de type 2 (Samuel and Shulman, 2012).

En cas de résistance à l'insuline, comme par exemple dans un diabète de type 2, l'insuline perd son action de régulation des métabolismes glucidique et lipidique. Le transport du glucose et son stockage dans les muscles ne sont plus augmentés par l'insuline, la glycémie n'est donc plus régulée correctement. La lipolyse dans le tissu adipeux n'est plus inhibée, causant l'augmentation de la quantité de lipides circulants. Dans le foie, la production de glucose endogène augmente, ainsi que la production de lipides, ce qui va entraîner un excès de triglycérides hépatiques et circulants, et une augmentation de la glycémie.

Lorsque la résistance à l'insuline s'installe, les mécanismes décrits précédemment ne sont plus régulés correctement. Les conséquences métaboliques seront notamment un manque d'inhibition de la néoglucogenèse et de la lipolyse, ainsi qu'une captation de glucose diminuée dans les organes insulinosensibles (Figure 11) (Samuel and Shulman, 2012).

Il en résulte une augmentation de la glycémie et de la lipidémie entraînant des conséquences néfastes à plus ou moins long terme.

Parmi les facteurs de développement de la résistance à l'insuline se retrouvent des facteurs génétiques mais surtout environnementaux, comme l'alimentation, la sédentarité, l'âge, la consommation de tabac et d'alcool mais aussi des interactions médicamenteuses (Wu *et al.*, 2014). L'obésité reprend également ces facteurs de risque et va jouer un rôle important dans la dérégulation de la sensibilité à l'insuline.

1. Dysfonction du tissu adipeux

La fonction première du tissu adipeux est le stockage des acides gras sous forme de triglycérides et la régulation de leur distribution dans la circulation sanguine. Les adipocytes jouent un rôle très important dans la régulation du métabolisme et de la sensibilité à l'insuline (Figure 12) (Beale *et al.*, 2004). Ce rôle intervient à la fois par le biais des acides gras libérés par les adipocytes mais aussi *via* la production d'une variété de cytokines spécifiques, les adipokines. De par leur mode de fonctionnement ces molécules sont couramment appelées hormones, le tissu adipeux étant considéré ainsi comme ayant une fonction endocrine.

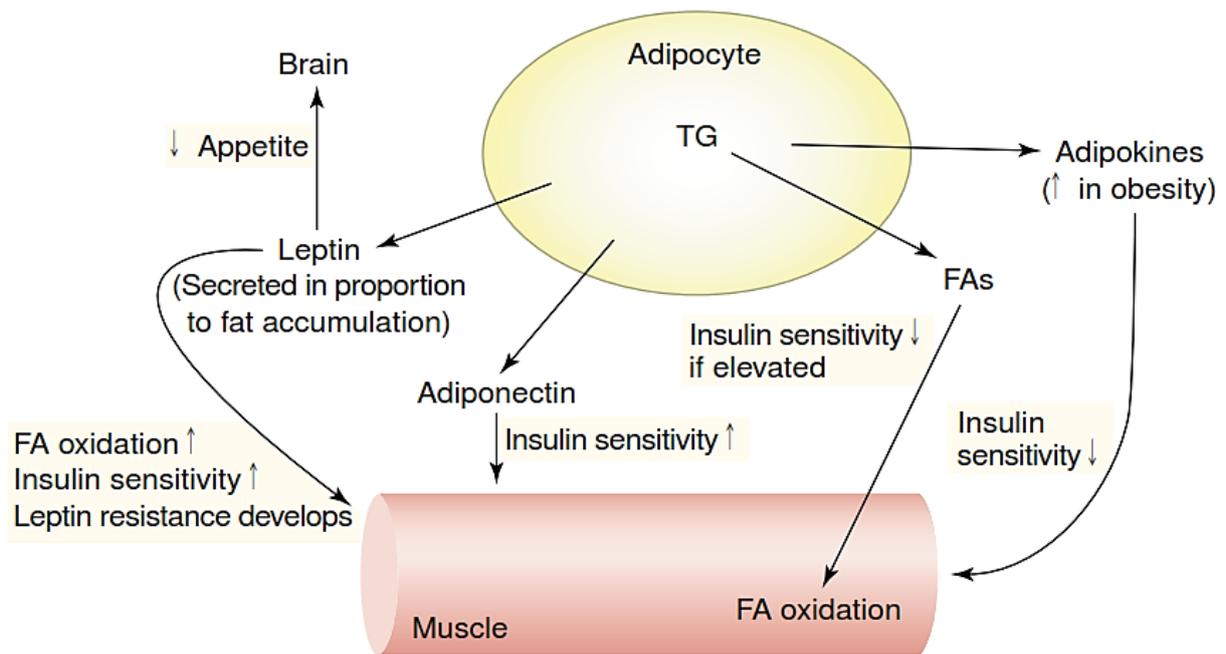


Figure 12 : Dysfonction du tissu adipeux (Beale *et al.*, 2004). Les acides gras et les adipokines issus du tissu adipeux jouent un rôle néfaste sur la sensibilité à l'insuline.

Depuis la découverte de la première adipokine, la leptine, en 1994, une centaine ont été identifiées (Lehr *et al.*, 2012). Parmi celles-ci se retrouvent de nombreuses molécules spécifiques au tissu adipeux, telles que la leptine, l'adiponectine ou la visfatine, mais également des cytokines pro-inflammatoires plus répandues, comme le $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor α), la MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein) ou l'IL-6 (Interleukin 6).

La leptine

La leptine, également appelée hormone de la satiété, est une hormone non glycosylée de 16 kDa, codée par le gène *ob* chez la souris et par le gène *LEP* chez l'homme. Son expression est proportionnelle à la masse de tissu adipeux et à la taille des adipocytes. La leptine est ainsi plus exprimée chez les obèses et sa production diminue avec la perte de poids (Ahima *et al.*, 2000). De plus, sa synthèse semble également régulée par des médiateurs inflammatoires (Ahima *et al.*, 1996). La leptine est appelée hormone de la satiété à cause de ses effets anorexigènes. *Via* une action sur l'hypothalamus, elle induit la production de facteurs anorexigènes comme CART (Cocaine Amphetamine Related Transcript), et réprime des facteurs orexigènes comme le neuropeptide Y (Gualillo *et al.*, 2000). La leptine a également

des effets sur le métabolisme lipidique, en prévenant l'accumulation de triglycérides hors du tissu adipeux, notamment par l'activation de l'AMPK (AMP activated protein kinase), connu pour être un senseur énergétique (Figure 13) (Kahn *et al.*, 2005). Cette activation est à la fois directe et indirecte. L'action de la leptine sur l'hypothalamus permet l'activation du système nerveux sympathique (SNS) et des récepteurs α -adrénergiques sur les tissus cibles (foie et muscles). La leptine peut également activer directement des récepteurs dédiés sur les tissus cibles. Quels que soient les récepteurs activés ces derniers vont alors activer le transport et l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie (Figure 13) (Kahn *et al.*, 2005). Il a également été montré que l'activation indirecte des récepteurs adrénergiques par la leptine permettait de stimuler le transport du glucose dans les tissus périphériques (Haque *et al.*, 1999). L'ensemble de ses caractéristiques font de la leptine une adipokine essentielle dans la régulation de la faim et des métabolismes glucidique et lipidique.

Grâce à ses effets bénéfiques sur la satiété et le métabolisme, la leptine a été envisagée comme thérapie de l'obésité. Ainsi des études ont été menées afin d'observer les effets bénéfiques d'un apport exogène de leptine, chez des souris ou des patients déficients en cette adipokine (Farooqi *et al.*, 2002). L'apport exogène de leptine a permis de réduire l'appétit et d'induire une perte de poids chez les

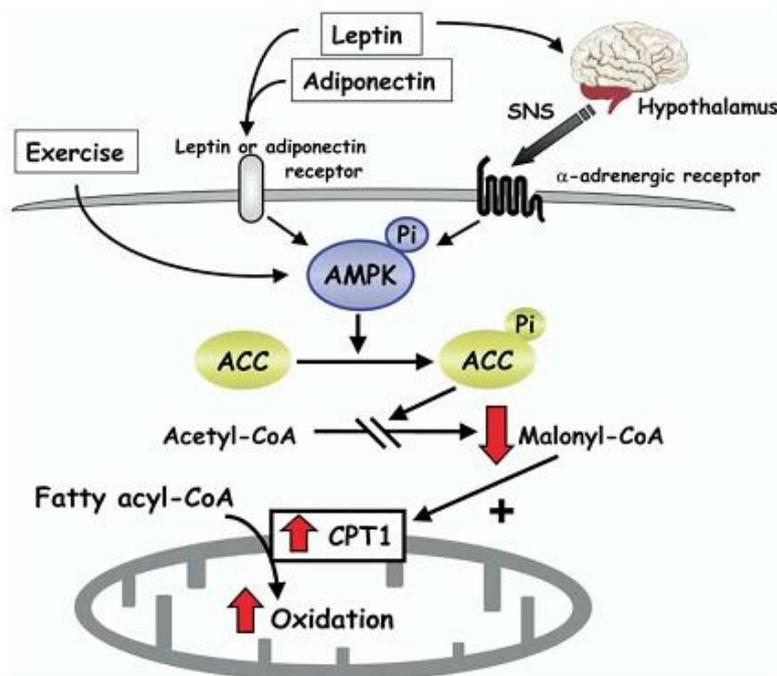


Figure 13 : Effet stimulant de l'AMPK sur la β -oxydation dans le muscle squelettique (Kahn *et al.*, 2005). L'exercice, la leptine et l'adiponectine, par différentes voies, activent l'AMPK dans le muscle squelettique. Cette activation provoque l'inhibition de la malonyl CoA synthase et l'activation de la carnitine palmitoyl transférase (CPT1). Ces changements vont provoquer l'augmentation de l'import et de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie.

patients. Toutefois les effets ont été plus modestes chez les individus obèses que chez les individus présentant une déficience en leptine. De plus l'expression de la leptine étant augmentée en fonction de la masse de tissu adipeux, la plupart des obèses présentent des taux plasmatiques de leptine très importants, sans pour autant profiter de ses effets bénéfiques. Ce paradoxe a conduit au concept de résistance à la leptine, qui est une conséquence de l'expression augmentée et prolongée de l'hormone (Münzberg and Myers, 2005). Il a ainsi été montré que la leptine perdait notamment son action sur le système central, à la fois *via* un défaut de son transport à travers la barrière hématoencéphalique, et par un défaut de sa signalisation, perdant ainsi son effet sur la satiété et le métabolisme.

L'adiponectine

Comme la leptine, l'adiponectine a un effet bénéfique sur le métabolisme des lipides et des glucides, ainsi que sur la sensibilité à l'insuline. L'adiponectine stimule l'oxydation des acides gras par la même voie de signalisation que la leptine (Figure 13) (Kahn *et al.*, 2005). Elle inhibe la néoglucogenèse en réprimant la PEPCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase) et la glucose-6-phosphatase. De plus elle a des effets anti-inflammatoires *via* la répression du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), hautement impliqué dans l'expression des molécules inflammatoires (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Toutefois, la modulation de l'expression de l'adiponectine est différente de celle de la leptine, son expression étant diminuée dans les cas d'obésité et de diabète de type 2. De plus des études ont montré une baisse de l'expression des récepteurs à l'adiponectine dans le foie et le muscle dans des modèles de souris obèses (Yamauchi *et al.*, 2007). Ces modifications vont ainsi perturber la signalisation de l'adiponectine et participer à un mauvais rétrocontrôle de la néoglucogenèse dans le foie et au développement de la résistance à l'insuline.

L'inflammation

À l'état physiologique, les adipocytes stockent les acides gras et les redistribuent aux muscles en cas de besoin énergétique. En cas d'apport calorique excessif la taille des adipocytes peut s'adapter afin de pouvoir stocker l'excédent de lipides. Toutefois la persistance d'un tel stress va conduire à l'hypertrophie des

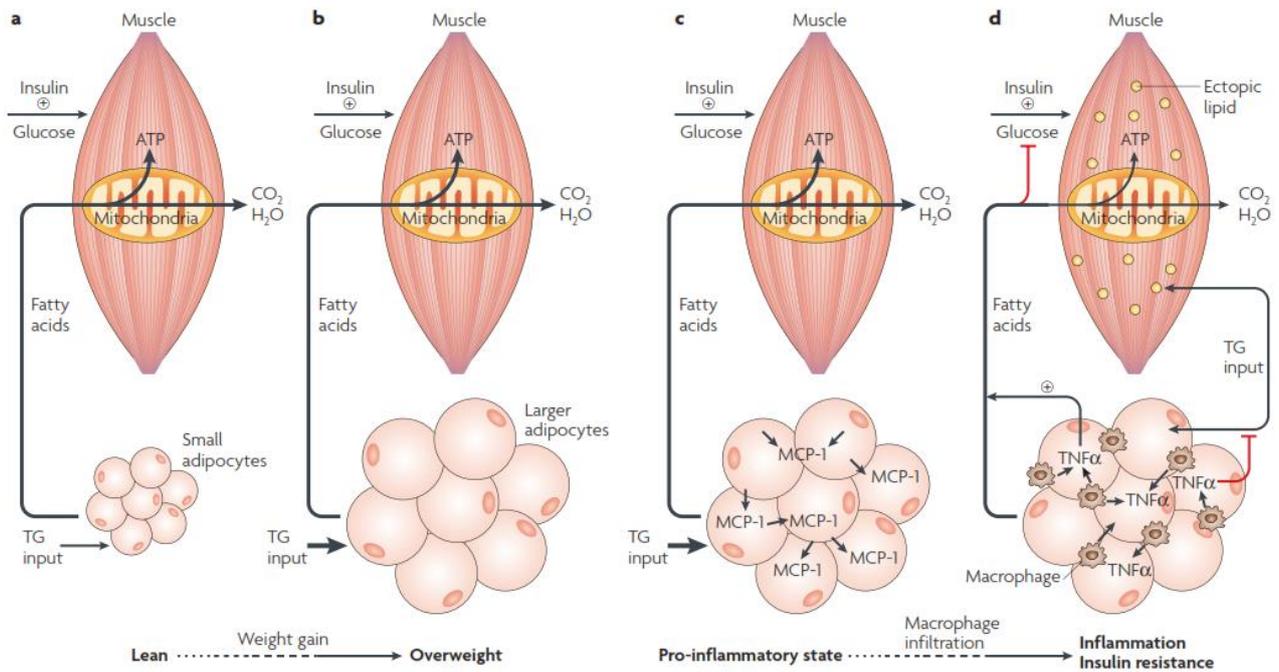


Figure 14 : L'inflammation chronique dans le tissu adipeux cause la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique (Guilherme *et al.*, 2008). (a) Chez un individu sain, les adipocytes gèrent le stock d'acides gras. (b) En cas de surpoids, la taille des adipocytes augmente. (c) La persistance de cet excès de lipides cause un stress déclenchant la production de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes. (d) Le tissu adipeux est infiltré de nombreux macrophages, une inflammation persistante de bas grade se met en place. La lipolyse est dérégulée, des lipides ectopiques peuvent s'accumuler dans les tissus musculaires et hépatiques à l'origine d'une insulino-résistance de ces tissus.

adipocytes, la dérégulation de leur fonction endocrine et l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières vont avoir un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline (Guilherme *et al.*, 2008) (Figure 14).

Il a été montré que MCP-1, cytokine permettant le recrutement des monocytes circulants, était grandement surexprimée dans le sérum de patients obèses et diabétiques de type 2 (Sartipy and Loskutoff, 2003). Les adipocytes hypertrophiés expriment massivement MCP-1, provoquant ainsi l'augmentation du taux de macrophages au sein du tissu adipeux, les monocytes captés se transformant en macrophages. Alors qu'un tissu adipeux sain est constitué de 5 à 10% de macrophages, chez des patients obèses il a été montré que les macrophages pouvaient représenter jusqu'à 50% du total des cellules (Weisberg *et al.*, 2003). Le résultat de ce changement de constitution du tissu adipeux va conduire à la mise en place d'une inflammation de bas-grade, persistante, pouvant interagir avec le métabolisme (Figure 14) (Guilherme *et al.*, 2008).

Les macrophages sont producteurs de différentes cytokines proinflammatoires comme l'IL1 β et surtout le TNF α qui vont participer à l'installation de la résistance à l'insuline et à la modification de l'homéostasie glucidique et lipidique. Ces cytokines inflammatoires agissent directement sur la fonction des adipocytes. Le TNF α va diminuer la captation des acides gras circulants par les adipocytes mais aussi leur stockage sous forme de triglycérides (Figure 15) (Guilherme *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que le TNF α pouvait réprimer l'activité des PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), un facteur de transcription régulant différents gènes impliqués dans ces phénomènes (Tesz *et al.*, 2007). De plus le TNF α active la lipase hormonosensible (HSL) et réprime la périlipine, responsables respectivement de la dégradation des triglycérides et du maintien de la structure des gouttelettes lipidiques face aux lipases (Langin and Arner, 2006). L'association de ces deux actions permet alors d'exacerber la lipolyse au sein des adipocytes et contribue à l'hyperlipidémie couramment rencontrée chez les individus obèses.

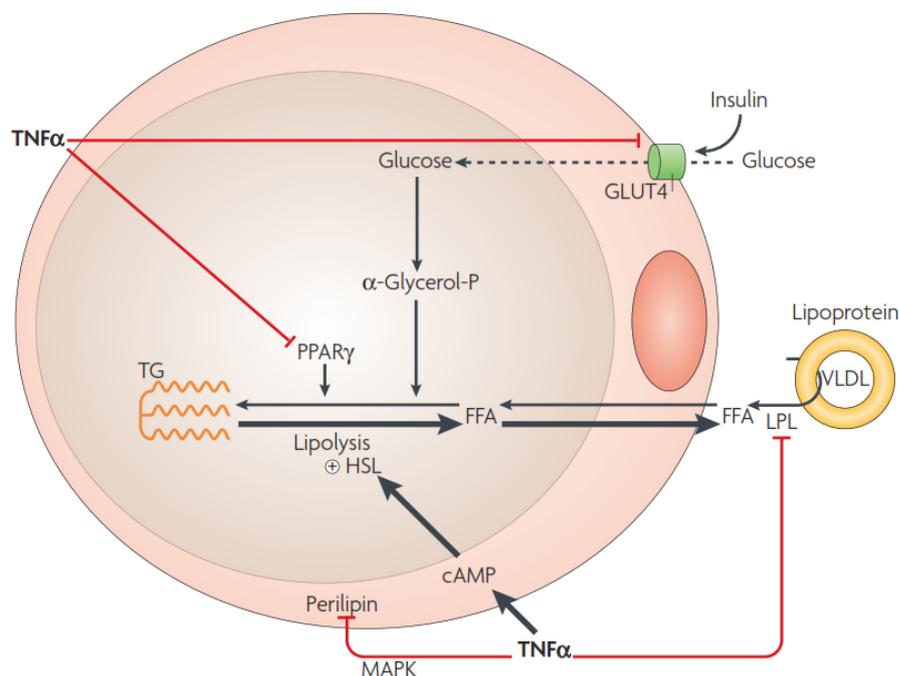


Figure 15 : Le TNF α induit la diminution du stockage des acides gras et augmente la lipolyse dans les adipocytes (Guilherme *et al.*, 2008).

Parallèlement à cette action sur le métabolisme des lipides, l'expression de GLUT4 est également diminuée dans les adipocytes issus d'individus obèses et diabétiques de type 2 (Garvey *et al.*, 1991). Ce défaut d'expression est lié à un effet répresseur du TNF α sur l'induction de l'expression des ARNm de GLUT4 en

réponse à l'insuline. L'action du $TNF\alpha$ est indirecte et passe par l'augmentation de la quantité de céramides, des molécules de signalisation lipidiques, au sein de la cellule. Il a été montré que les céramides étaient capables d'inhiber l'activation de Akt, une protéine kinase impliquée dans la signalisation intracellulaire en aval des récepteurs à l'insuline (Summers *et al.*, 1998). Ainsi, le $TNF\alpha$ est impliqué à la fois dans le dérèglement du métabolisme des lipides et des glucides (Figure 15) (Guilherme *et al.*, 2008).

Résumé

L'excès de tissu graisseux viscéral conduit à une dérégulation des expressions d'adipokines et de la lipolyse. Ces anomalies vont contribuer à des perturbations sévères des métabolismes glucidique et lipidique ainsi qu'au développement de la résistance à l'insuline. Il existe un très grand nombre d'adipokines et beaucoup de mécanismes et interactions restent à identifier. Il est toutefois possible de schématiser le rôle des adipokines et le dysfonctionnement du tissu adipeux dans le développement de la résistance à l'insuline par la Figure 16 (Rabe *et al.*, 2008).

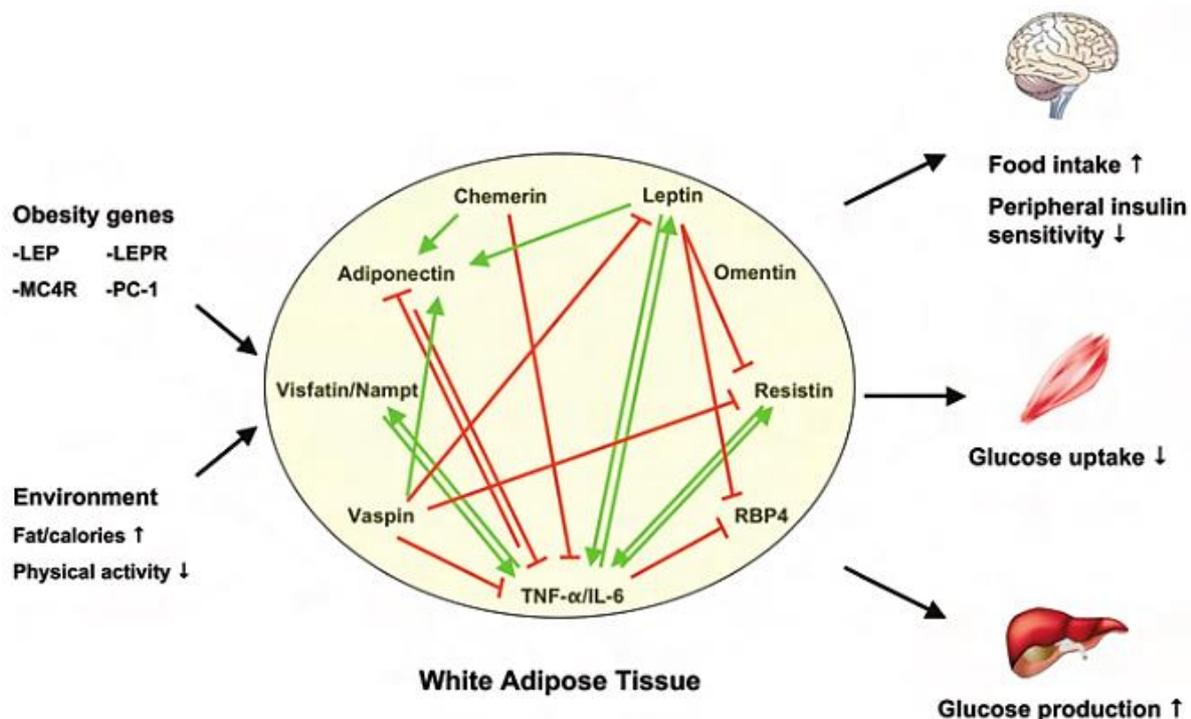


Figure 16 : Obésité, adipokines et insulino-résistance (Rabe *et al.*, 2008). Les flèches vertes représentent une stimulation alors que les lignes rouges représentent une inhibition de l'expression des gènes. Les modifications de l'expression des adipokines et cytokines, causées par des facteurs environnementaux tels que l'obésité, provoquent une perte de sensibilité à l'insuline.

2. Résistance à l'insuline

Avec la dérégulation de l'homéostasie lipidique dans les adipocytes, la lipidémie augmente. Associée à des défauts du métabolisme des lipides, le corps n'est alors plus à même de se protéger d'un excès d'acides gras qui vont s'infiltrer dans tous les tissus. L'accumulation de lipides ectopiques, la stéatose, dans des tissus comme le foie, le muscle squelettique ou encore le cœur va causer de plus amples dysfonctionnements du métabolisme et un stress oxydant, endommageant ainsi ces tissus. C'est la lipotoxicité (pour plus de détails sur le cas particulier de la stéatose hépatique, voire partie sur les stéatohépatopathies). Parmi les voies d'action mises en jeu par cet excès de lipides se trouve la signalisation à l'insuline.

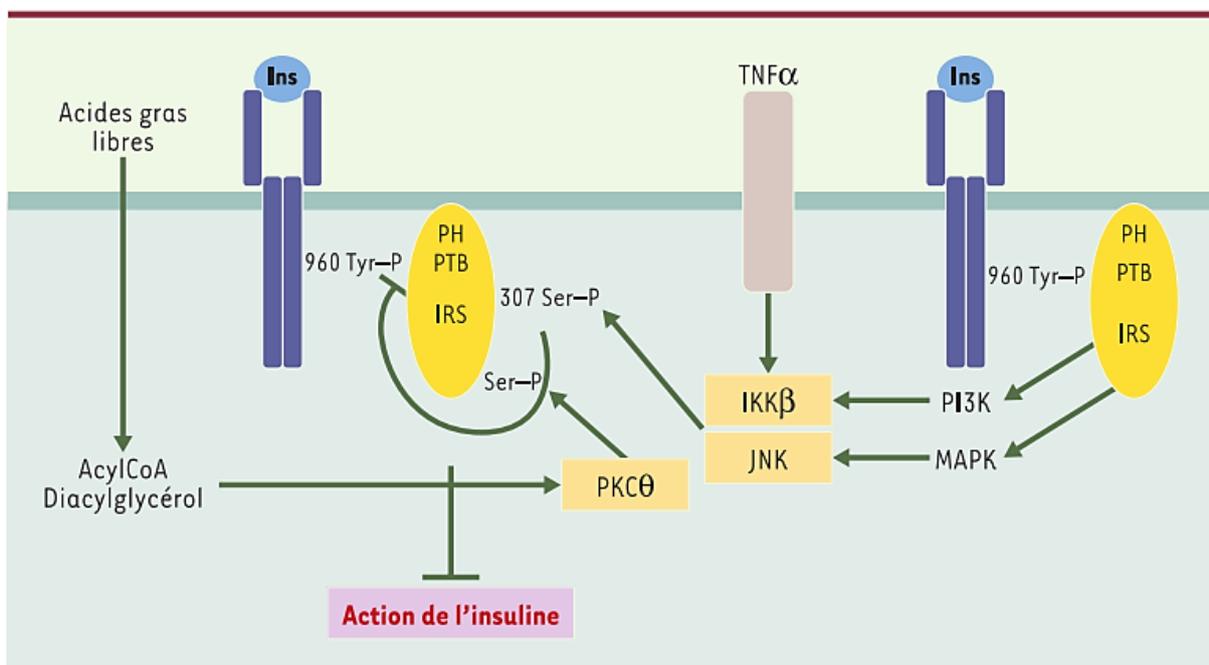


Figure 17 : Inhibition de la signalisation à l'insuline par la phosphorylation des résidus Sérine/Thréonine des protéines IRS (Capeau, 2003). Cette phosphorylation résulte d'un rétrocontrôle par l'insuline ou de l'action d'autres agents comme le TNF α ou les acides gras libres.

En conditions physiologiques, la signalisation en aval des récepteurs à l'insuline se fait *via* la phosphorylation de résidus tyrosine sur les protéines IRS. Or, il a été montré chez des patients diabétiques de type 2, que la quantité d'IRS phosphorylées sur des résidus tyrosine n'augmentait pas en réponse à une augmentation de l'insulinémie, contrairement à ce qui est observé chez des

individus sains. Toutefois cette différence ne provient pas d'un déficit d'IRS chez les patients diabétiques, leur expression étant identique (Björholm *et al.*, 1997).

Si la phosphorylation des résidus tyrosine permet la signalisation intracellulaire, la phosphorylation des résidus sérine/thréonine des IRS provoque au contraire l'inactivation du récepteur. Différents signaux sont capables d'activer cette voie antagoniste inhibitrice de la signalisation des IRS et d'induire une résistance à l'insuline (Le Roith and Zick, 2001). Les acides gras libres, les diacylglycérols (DAG), l'acyl-CoA, mais aussi des cytokines pro inflammatoires comme le TNF α ou l'IL1 β , et même l'insuline elle-même font partie de ces signaux (Figure 17) (Capeau, 2003).

L'accumulation de DAG et d'acyl-CoA produits en réponse à l'augmentation d'acides gras libres conduit à l'activation de la PKC θ (Protein Kinase C theta), responsable de la phosphorylation de IRS1 sur des résidus thréonine et sérine. Le TNF α , également sécrété par le tissu adipeux dérégulé, provoque quant à lui la phosphorylation d'autres résidus sérine/thréonine *via* l'activation du facteur IKK β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase) et la protéine kinase *jun* (JNK). Or, ces derniers sont également sous le contrôle de la PI3K et de la MAPK, les principales kinases activées également par le récepteur à l'insuline. Ce mécanisme de rétrocontrôle négatif permettrait d'expliquer la désensibilisation des IRS, même en cas d'hyperinsulinémie (Lee *et al.*, 2003).

3. *Dysfonction mitochondriale*

Les acides gras sont la principale source d'énergie du muscle squelettique. Pendant l'effort, plus de 90% de la production d'ATP (Adenosine TriPhosphate) provient de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Toutefois, chez les individus obèses insulino-résistants et les diabétiques de type 2, l'oxydation des acides gras est moindre, le métabolisme glucidique étant favorisé. Une diminution de la β -oxydation a dès lors été mise en évidence, suggérant des anomalies au niveau mitochondrial (Kelley and Mandarino, 2000). La perte de capacité du muscle squelettique à favoriser l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie a

été appelée "inflexibilité métabolique". Elle va être un facteur déterminant dans le développement de la résistance à l'insuline du muscle squelettique. En n'assurant pas l'élimination des lipides ectopiques accumulés dans le muscle suite à l'augmentation de la lipolyse du tissu adipeux des personnes obèses, cette inflexibilité métabolique va encore favoriser l'accumulation de ces lipides et de leurs métabolites associés comme les DAG (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2008). Des concentrations croissantes de ces métabolites vont gravement altérer la production d'ATP par les mitochondries en inhibant la chaîne de transport des électrons et en perturbant le potentiel de membrane interne de la mitochondrie (Abdul-Ghani *et al.*, 2008).

Ainsi la mitochondrie se retrouve au sein d'un cercle vicieux. Elle va être à la fois victime et responsable de l'insulinorésistance grandissante. Elle subit les conséquences de l'accumulation de lipides ectopiques, et par le dysfonctionnement de la β -oxydation elle contribue à leur accumulation et au dérèglement du métabolisme et de la signalisation à l'insuline. De plus, les perturbations de la chaîne de transport des électrons et du potentiel de membrane conduisent à la production d'espèces réactives de l'oxygène très nocives pour la cellule et causant sur la durée un stress oxydant (Feldstein *et al.*, 2004; Malhi *et al.*, 2006).

4. Cas du foie et stéatohépatopathie

Le foie tient le premier rôle dans l'apparition de l'hyperglycémie à jeun observée chez les patients diabétiques de type 2. En effet, chez ces patients, la production de glucose à jeun est augmentée (Meyer *et al.*, 1998). Comme dans le muscle squelettique, l'hyperlipidémie et l'accumulation de lipides ectopiques dans le foie vont perturber la signalisation à l'insuline et les métabolismes lipidique et glucidique. Ainsi chez les patients diabétiques la production de glucose endogène n'est plus régulée correctement. La perte de l'inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse est proportionnelle à l'augmentation de la quantité d'acides gras libres circulants (Boden, 2011). Les mécanismes d'insulinorésistance mis en œuvre par l'excès d'acides gras sont similaires à ceux observés dans le muscle squelettique, notamment ceux impliquant l'interaction des acides gras et de leurs métabolites avec les récepteurs à l'insuline.

Durant le développement de l'insulinorésistance, et en présence d'une obésité, le foie est fréquemment touché par des pathologies appelées stéato-hépatopathies non alcooliques (ou NAFLD pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Ces NAFLD représentent un large spectre de pathologies de gravités graduelles allant de la simple stéatose hépatique, une accumulation de lipides dans les hépatocytes, à la fibrose, la cirrhose et même l'hépatocarcinome. Il est estimé qu'aujourd'hui 25% de la population mondiale serait touchée par les NAFLD (Younossi *et al.*, 2015). La deuxième partie de ce manuscrit traite de ces NAFLD et détaille leur pathogenèse.

4) Méthodes de mesure de la sensibilité à l'insuline

1. Le clamp euglycémique hyperinsulinémique

La technique de référence pour mesurer la sensibilité à l'insuline reste aujourd'hui le clamp euglycémique hyperinsulinémique (DeFronzo *et al.*, 1979). Cette technique se base sur le calcul d'un GIR (Glucose Infusion Rate), représentatif de la sensibilité systémique à l'insuline. Pour cela le patient est perfusé avec de l'insuline à débit constant, le mettant en état d'hyperinsulinémie, stimulant ainsi le transport du glucose dans les tissus sensibles à l'insuline et stoppant la production endogène de glucose. La glycémie du patient, attentivement surveillée tout au long du protocole, va alors diminuer, et être ajustée à une valeur fixe grâce à une perfusion à débit variable de glucose. Cet ajustement, généralement autour de 100 mg/dL, est maintenu pendant 2 à 3 heures, le temps que l'état d'équilibre entre perfusion d'insuline et perfusion de glucose soit établi. Un niveau de glycémie précis est ainsi maintenu. La quantité de glucose nécessaire au maintien de cet équilibre est alors appelée GIR (en mg/kg/min), elle est ajustée à la masse de l'individu afin de tenir compte du volume de distribution du glucose. Cette valeur représente donc la consommation de glucose par les tissus sensibles à l'insuline, ainsi, plus le patient consomme de glucose sous insuline, plus le GIR sera important, et donc plus sa sensibilité à l'insuline est élevée. Cette technique est aujourd'hui considérée comme le *gold standard*, présentant une bonne

reproductibilité et une bonne répétabilité (Le *et al.*, 2009), les méthodes alternatives lui sont ainsi généralement comparées.

Pourtant cette technique présente également de nombreux inconvénients dont le plus évident est sa difficulté de mise en œuvre. Le calcul d'un GIR n'est en effet possible qu'après 3 heures de clamp nécessitant la pose de cathéters et la surveillance du patient par du personnel qualifié. La complexité du protocole la rend ainsi impossible à utiliser en routine clinique pour le diagnostic de patients insulino-résistants à grande échelle, ou même pour un suivi longitudinal de ces derniers.

2. HOMA

Le modèle HOMA, pour *HOmeostasis Model Assessment*, est un modèle mathématique, mis au point en 1985 et permettant de calculer un index de sensibilité à l'insuline à partir des concentrations à jeun de glucose et d'insuline (Matthews *et al.*, 1985). L'index d'HOMA est calculé par la formule $IR_{HOMA} = (I \times G)/22.5$, où I est l'insulinémie à jeun et G la glycémie à jeun. Sa faisabilité lui confère un grand avantage par rapport au clamp euglycémique hyperinsulinémique, et permet au HOMA d'être bien plus largement utilisé dans les études cliniques à fort effectif par exemple. Pour autant cette technique n'est pas réputée pour proposer des valeurs corrélant exactement avec le standard, le clamp euglycémique hyperinsulinémique, même si les résultats restent acceptables (Wallace *et al.*, 2004). Pour autant il n'est pas surprenant d'obtenir des résultats un peu différents. En effet le clamp euglycémique hyperinsulinémique et l'index HOMA ne sont pas réalisés dans des conditions comparables. D'un côté le clamp hyperinsulinémique est plutôt représentatif de la captation du glucose par les tissus périphériques, l'activité du foie étant totalement inhibée par les grandes quantités d'insuline administrées au patient. De l'autre côté, le HOMA, calculé à jeun, va plutôt mettre en valeur la sensibilité à l'insuline du foie, via la mesure de la glycémie à jeun (Tripathy *et al.*, 2004).

Toutes les méthodes utilisant les valeurs d'insulinémie se heurtent également à un problème récurrent de fiabilité des dosages de l'insuline. En effet différents problèmes de précision et de cross-réactivité ont été démontrés dans certains tests commerciaux, ainsi qu'un manque de performance altérant la fiabilité des mesures pour les concentrations d'insuline les plus basses (Marcovina *et al.*, 2007). Ce manque de standard dans les techniques de mesure de l'insuline nuit à l'harmonisation des résultats obtenus et ainsi à la reproductibilité des index de sensibilité à l'insuline qui en découlent.

3. QUICKI

Comme le HOMA, le QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) est un index basé sur les concentrations plasmatiques à jeun d'insuline et de glucose. Il est calculé selon la formule $IR_{QUICKI} = 1 / (\log G + \log I)$ (toujours avec I l'insulinémie à jeun et G la glycémie à jeun). Cette méthode a montré de bons résultats de reproductibilité et de sensibilité et corrèle avec les valeurs obtenues par le clamp euglycémique (Katz *et al.*, 2000). Toutefois, comme le HOMA, cette technique dépend de la mesure de l'insulinémie et en reprend ainsi les limitations.

4. Tests de tolérance au glucose et dérivés

L'OGTT (Oral glucose Tolerance test) est un test simple, utilisable en routine clinique, qui consiste à faire ingérer à un patient à jeun une solution à haute teneur en glucose. Deux heures après la prise de glucose la glycémie et l'insulinémie sont mesurées et comparées à celles obtenues à jeun. À partir de ces données, différents index ont été mis au point, avec par exemple les index Avignon, Stumvoll ou Belfiore (Gutch *et al.*, 2015) pour revue. Toutefois le plus connu et le plus utilisé en clinique au côté des index QUICKI et HOMA est l'index de Matsuda. Il est calculé selon la formule : $10000 / \sqrt{G_0 \times I_0 \times G_{moyen} \times I_{moyen}}$, avec G_0 et I_0 la glycémie et l'insulinémie à jeun, et G_{moyen} et I_{moyen} la glycémie et l'insulinémie moyenne au cours de l'OGTT. Ce dernier a montré une bonne corrélation avec le clamp chez des patients non diabétiques et intolérants au glucose mais s'est avéré plus faible avec des patients diabétiques de type 2 (Matsuda and DeFronzo, 1999).

5. Biomarqueurs

Différentes panoplies de biomarqueurs ont été évaluées pour la mesure de la sensibilité à l'insuline. En 2013, un test a été développé, regroupant différents métabolites et paramètres dans un algorithme permettant de calculer un index de résistance à l'insuline (Cobb *et al.*, 2013). Appelé Quantose IR, il se base sur la mesure à jeun d'acide oléique, d' α -hydroxybutyrate, d'insuline et de linoleoyl-glycerophosphocholine plasmatiques. Pris ensembles, ces différents paramètres sont témoins de dysfonctions des métabolismes glucidique et lipidique et ont permis de prédire la progression de la résistance à l'insuline sur 3 ans chez des patients. En 2015 l'utilité clinique de cet index a été évaluée chez 428 patients intolérants au glucose traités à la pioglitazone pendant plus de 2 ans (Tripathy *et al.*, 2015). L'index Quantose IR a varié parallèlement aux changements de sensibilité à l'insuline induits par le traitement. De plus l'index a permis de discriminer des populations de différentes sensibilités au glucose (patients sains, patients intolérants au glucose et patients diabétiques de type 2).

Pour résumer, de nombreuses méthodes de mesure et de calcul de l'insulinorésistance ont été mises au point et évaluées. Toutefois malgré les résultats intéressants offerts par certaines méthodes, et leur facilité de mise en œuvre, aucune n'a pu se positionner comme alternative fiable au clamp euglycémique hyperinsulinémique, qui reste la méthode de référence.

5) Méthodes d'étude du transport du glucose

De nombreuses pathologies sont associées à des anomalies du métabolisme du glucose ou à des perturbations de son transport, comme par exemple le diabète de type 2 ou encore les ischémies myocardique ou cérébrale (Cefalu, 2008). La prévalence du diabète est en nette augmentation dans les pays industrialisés et les nombreuses complications qui lui sont associées en font un véritable problème de santé publique (Radziuk, 2000). Le stade qui précède l'apparition des signes cliniques du diabète de type 2 est appelé stade pré-diabétique. Il est caractérisé par un état d'insulinorésistance, dont le signe majeur est un défaut de transport

du glucose en réponse à l'insuline, dans les organes insulinosensibles, tels que le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. La détection précoce de cet état, *via* l'étude du transport du glucose, permettrait une meilleure prise en charge des patients mais aussi un meilleur suivi de leur état métabolique. Plusieurs techniques ont alors été proposées pour cette mesure.

1. Spectroscopie à résonance magnétique

La spectroscopie à résonance magnétique ou MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy) est une technique analytique se basant sur les mêmes principes que l'imagerie par résonance magnétique : l'analyse des signaux électromagnétique provenant de certains noyaux atomiques dont le spin nucléaire a été placé dans un champ magnétique. Quand l'imagerie par résonance magnétique utilise ces informations afin de reconstruire des images en deux ou trois dimensions, la spectroscopie par résonance magnétique s'en sert pour identifier et de quantifier la formation et la dégradation de molécules d'intérêt au sein du volume étudié. La MRS a permis d'explorer les mécanismes de la résistance à l'insuline et de l'altération du transport du glucose. Cette technique a par exemple permis de mettre en évidence, dans le muscle squelettique humain, un défaut de synthèse de glycogène chez des individus résistants à l'insuline, suggérant ainsi un défaut de transport du glucose *et/ou* de la phosphorylation (Roden and Shulman, 1999). Par la suite cette technique a permis de confirmer le défaut de transport du glucose stimulé par l'insuline dans le muscle squelettique mais aussi les mécanismes cellulaires conduisant à ce défaut de transport (pour revue (Petersen and Shulman, 2006; Shulman, 2004)). Si la MRS permet des études poussées sur les flux de métabolites et a permis de grandes avancées dans la compréhension de la pathogenèse de la résistance à l'insuline, elle est toutefois inapplicable à plus grande échelle de par sa complexité.

2. Imagerie PET

L'utilisation de radiotraceurs permet l'étude *in vivo* de l'utilisation du glucose dans différents tissus. Le plus connu de ces traceurs est sans doute le FDG marqué au fluor 18 ($[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose). Comme le glucose, il entre dans la cellule via les GLUT, puis il est phosphorylé par l'hexokinase. Toutefois, contrairement à ce dernier il n'est pas pris en charge par la glucose-6-phosphatase et va donc rester piégé dans la cellule sous sa forme phosphorylée (Gallagher *et al.*, 1978). Le FDG est utilisé couramment en cardiologie, en neurologie et surtout oncologie où sa capacité à s'accumuler permet de refléter la consommation de glucose des cellules d'intérêt. Cependant la captation de FDG représente à la fois le transport du glucose et sa phosphorylation et ne permet pas en l'état de s'intéresser à la seule étape du transport du glucose.

Le 3OMG (3-O-methyl-D-glucose) est un traceur pur du transport du glucose. Il rentre dans les cellules par les GLUT mais n'est pas ensuite phosphorylé, ainsi il en ressort rapidement par les mêmes transporteurs (Csaky and Wilson, 1956). L'étude de la captation du 3OMG permet de s'intéresser uniquement au transport du glucose. Marqué au carbone 11, le 3OMG a permis d'étudier *in vivo* le transport du glucose dans le cerveau par exemple (Feinendegen *et al.*, 1986). Cependant le carbone 11 a une période très courte de 20 minutes, limitant son utilisation à proximité d'un cyclotron médical, son lieu de production. Le 3OMG a par la suite été marqué au carbone 14. Malgré sa demi-vie particulièrement longue de 5000 ans, des études réalisées chez l'homme ont permis de mettre en évidence une anomalie du transport du glucose en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique de patients diabétiques (Bonadonna *et al.*, 1996, 1993). Grâce à un modèle mathématique il est possible de modéliser les échanges du traceur entre différents compartiments biologiques (plasma et tissus) et ainsi d'évaluer le transport du glucose et sa modulation par l'insuline (Bertoldo *et al.*, 2005).

Par la suite une méthode "triple-traceur" a été mise au point. Grâce à l'utilisation conjointe de $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, $[^{11}\text{C}]\text{3OMG}$ et ^{18}FDG en imagerie PET il est possible de mesurer à la fois le débit sanguin, le transport du glucose et à sa

phosphorylation respectivement (Bertoldo *et al.*, 2006). Cette technique permet d'identifier les différentes cinétiques mises en jeu dans le métabolisme du glucose et leur modulation par l'insuline. L'application de cette technique triple-traceur a permis de montrer que la phosphorylation, mais surtout le transport du glucose en réponse à l'insuline était sévèrement altéré chez les patients diabétiques de type 2 (Goodpaster *et al.*, 2014).

Compte tenu de leurs périodes respectives, ni le $[^{11}\text{C}]\text{3OMG}$, ni le $[^{14}\text{C}]\text{3OMG}$ ne sont utilisables en clinique. De plus les études en imagerie PET utilisées dans ces protocoles nécessitent toutes le maintien du patient sous clamp euglycémique.

3. Le 6DIG

Le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose ou 6DIG est un analogue du glucose, radiomarké à l'iode 123 (R_γ : 159 keV, $T_{1/2}$: 13,2h) ou 125 (R_γ : 27 keV, $T_{1/2}$: 59,9j). Il a été développé au sein du laboratoire "Radiopharmaceutiques Biocliniques" dans l'optique de développer une méthode permettant l'évaluation du transport du glucose *in vivo*. Le radiomarkage à l'iode 123 ou 125 permet la détection du traceur en imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). L'iode 125 avec sa longue demi-vie présente un avantage pratique en recherche, évitant ainsi Des marquages répétés de la molécule. L'iode 123, avec une demi-vie de 13,2 heures est lui facilement utilisable en routine clinique.

Le 6-DIG a été sélectionné à partir de différents analogues de la molécule de glucose, marqués à l'iode 123 sur différentes positions (Koumanov *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2004). Ils ont été étudiés dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* : cardiomyocytes de rats, érythrocytes humains en suspension, cœur de rat isolé et biodistribution chez la souris (Henry *et al.*, 1995). Les analogues iodés en position 1, 2, 3, 4 et 5 de la molécule de glucose n'ont pas présenté d'interactions avec le transporteur du glucose, mais le 6-deoxy-6-iodo-D-glucose ou 6DIG, a montré un comportement similaire à celui du 3OMG, le traceur du transport du glucose de référence. Le 6DIG entre dans les cellules *via* les transporteurs du glucose mais n'est pas substrat de l'hexokinase. Non métabolisé à l'intérieur de la cellule, il ressort alors par le même transporteur. (Henry, Koumanov, *et al.*, 1997). De plus,

il a été montré que le transport du 6DIG est augmenté par l'insuline (Henry, Tanti, *et al.*, 1997). Étudié sur de nombreux modèles biologiques, le 6-DIG a été validé comme traceur pur du transport du glucose.

La 6DIG a ensuite été évaluée dans une étude de biodistribution, sur des souris saines et diabétiques, avec ou sans stimulation à l'insuline (Perret *et al.*, 2003). Il a alors été montré que le transport du 6DIG était significativement augmenté dans les tissus sensibles à l'insuline, après stimulation par cette dernière, chez les souris saines, mais pas chez les souris diabétiques. Ces résultats se retrouvent dans une autre étude mettant en œuvre des rats rendus insulino-résistants par un excès de fructose dans l'alimentation, sous clamp euglycémique hyperinsulinémique (Perret *et al.*, 2007). Grâce à un modèle mathématique multi-compartimental il a été possible de calculer les coefficients de transport du 6DIG, du sang vers différents organes, sensibles ou non au glucose. L'étude de ces coefficients de transfert permet de s'intéresser à la dynamique du transport du traceur. Cette modélisation a permis de montrer que le cœur et le diaphragme étaient les organes où l'insuline induisait les plus fortes variations sur les paramètres du modèle. Ces résultats font ainsi du cœur l'organe le plus intéressant pour l'étude des variations de transport du glucose, dans l'insulinorésistance notamment, *in vivo* et en imagerie SPECT, grâce au 6DIG.

Grâce à la modélisation mathématique il est possible d'utiliser les données biologiques obtenues de manière expérimentale afin de quantifier l'IR. Un modèle mathématique plus simple, ainsi qu'une méthode de détection externe de la radioactivité ont alors été développés afin de pouvoir envisager l'utilisation de ce traceur en pratique clinique (Briat *et al.*, 2007; Slimani *et al.*, 2002). Dans cette publication se retrouve pour la première fois la méthodologie utilisée dans ce travail de thèse. Il s'agit d'un protocole en deux phases d'acquisition de la radioactivité après injection du 6-DIG, une en condition basale, et une après stimulation par l'insuline. La radioactivité est détectée de manière externe grâce à une gamma caméra et permet d'obtenir une cinétique cardiaque et une cinétique sanguine. L'analyse des données dans un modèle mathématique à 3 compartiments permet de calculer les coefficients de transfert du traceur dans le

cœur dans les deux conditions. L'insuline augmentant le coefficient de transfert du traceur dans un cœur sain, la comparaison des coefficients de transfert avec ou sans insuline chez un même individu permet le calcul d'un ratio représentatif de l'effet de cette dernière (Briat *et al.*, 2007). Cette étude a montré pour la première fois la faisabilité de la mesure de l'IR cardiaque *in vivo*.

Ces points de méthodologie ont par la suite été adaptés à l'imagerie du 6DIG à l'aide d'une gamma-caméra dédiée au petit animal. Ce dispositif permet de suivre la radioactivité dans le cœur alors que l'activité sanguine est obtenue grâce à des prélèvements sanguins, le tout en condition basale et en présence d'insuline. Cette étude a montré la capacité de ce protocole à calculer un index d'insulinorésistance cardiaque appelé index R. Ce dernier permet de discriminer un groupe de rats sains d'un groupe de rats insulinorésistants (Vollaire, 2010). Un index d'IR a également été obtenu pour le muscle squelettique mais la modélisation de ce dernier nécessite cependant un temps d'acquisition plus important. Les index d'IR pour le muscle squelettique et le cœur obtenus au cours de cette étude corrèlent significativement avec le GIR (Glucose Infusion Rate). Parallèlement à ces travaux, le 6DIG a été transféré en clinique dans le cadre d'une phase I-IIa suite à une optimisation du protocole et de la modélisation mathématique. La principale optimisation repose sur l'obtention de cinétiques sanguines sans avoir recours aux prélèvements. Ceci est permis grâce au traitement des séquences d'image par une méthode d'analyse factorielle permettant d'isoler la cinétique sanguine directement sur ces dernières. La transposition de la méthodologie d'analyse factorielle des séquences d'image aux études précliniques a été évaluée (Henri, 2011).

6) Modèles animaux

Que ce soit dans le cadre de recherches fondamentales destinées à décrypter les mécanismes de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, ou pour l'évaluation de thérapeutiques, les modèles animaux sont largement utilisés. Les rongeurs sont généralement privilégiés pour leur facilité d'élevage, leur similarité génétique avec l'homme et la diversité des pathologies développables. Afin d'étudier la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 il existe différents modèles

généétiques ou nutritionnels de rongeurs, représentatifs des différents stades de la pathologie. Les plus connus seront évoqués dans cette partie.

1. Modèles nutritionnels

L'induction de l'obésité et de la résistance à l'insuline par le biais de régimes alimentaires spécifiques permet de mimer au mieux le développement de la pathologie humaine et ses caractéristiques progressives.

a. Régime fructose

De nos jours le fructose est présent en quantité importante dans l'alimentation industrielle. Il est largement utilisé comme additif sucrant dans les sodas, les jus de fruits et autres produits sucrés. La consommation quotidienne de fructose est responsable d'un apport calorique excessif participant au développement de l'obésité (Bocarsly *et al.*, 2010). Une résistance à la leptine a été mise en évidence chez des rats Sprague-Dawley nourris avec un régime à haute teneur en fructose pendant 6 mois (Shapiro *et al.*, 2008). Cette résistance à la leptine empêche la bonne régulation de la faim, et participe à l'apparition de l'obésité liée à une surnutrition. De plus un régime à haute teneur en fructose chez le rat permettait également de développer d'autres caractéristiques du syndrome métabolique telles que la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension ((Tran *et al.*, 2009) pour revue). Ces effets sont dépendants de la durée du régime et de sa teneur en fructose, permettant ainsi de varier les phénotypes obtenus, ce genre de régime est ainsi généralement utilisé pour l'obtention d'un modèle murin d'insulinorésistance modérée.

b. Régimes hyperlipidémiques

L'utilisation de régimes hypercaloriques et hyperlipidémiques (régimes HFD pour High Fat Diet) est très répandue dans l'étude du syndrome métabolique et de ses complications (maladies cardiovasculaires et stéatoses hépatiques par exemple). Ils permettent de développer une obésité et une résistance à l'insuline modulable en fonction de la durée et de la composition du régime. Il existe énormément de HFD différents, faisant varier à la fois le pourcentage de calories apportés par les lipides (entre 30 et 60% généralement) mais aussi la nature de ces derniers ((Buettner *et al.*, 2007) pour revue). L'apport lipidique peut ainsi provenir

de saindoux, de graisse de coco, d'huiles végétales ou de poisson par exemple. Lors de la mise sous HFD la prise de poids est graduelle et atteint généralement 10 à 20% après une dizaine de semaines de régime. De plus la nature des lipides influe sur cette dernière, permettant d'obtenir des modèles variés dans la sévérité du développement des symptômes du syndrome métabolique. Ces types de régime ont ainsi ouvert la voie à de nombreuses études sur les différents types d'acides gras et leurs effets néfastes ou bénéfiques sur le métabolisme. Ainsi le saindoux permettant d'obtenir une des prises de poids les plus rapides mais aussi les défauts métaboliques et l'insulinorésistance la plus importante (Buettner, 2006). Au contraire les huiles de poissons, acides gras poly insaturés, causeraient une résistance à l'obésité grâce à un effet stimulateur de la β -oxydation (Jump, 2002).

c. Régimes "western" et "cafeteria"

Les régimes western et cafeteria ont pour objectif de mimer les déséquilibres de l'alimentation des pays occidentaux, en partie responsable de la progression de l'obésité et du syndrome métabolique. Ces régimes combinent ainsi à la fois un excès de glucides et un excès de lipides. Cet excès d'apport énergétique permet ainsi d'induire une obésité, une résistance à l'insuline et globalement un ensemble de dysfonctions plus importantes qu'avec de simples régimes fructose ou HFD (Kretschmer *et al.*, 2005; Sampey *et al.*, 2011).

2. Modèles génétiques

Les modèles génétiques de rongeurs diabétiques et/ou obèses sont couramment utilisés en laboratoire. Ces modèles sont issus de la sélection de mutations spontanées dans des lignées déjà utilisées. Elles permettent le développement spontané des pathologies d'intérêt sans intervention supplémentaire, favorisant ainsi la reproductibilité des études.

a. Souris ob/ob

La lignée de souris ob/ob est une lignée de souris obèses reposant sur la mutation du gène de la leptine. Cette mutation a été découverte sur une lignée de souris non consanguines avant d'être maintenue par la suite dans une lignée de souris C57BL/6J au sein des laboratoires Jackson dans les années 1970 (Coleman, 1978). Ces souris défaillantes en leptine sont caractérisées par une obésité

marquée, une hyperphagie, une hyperglycémie transitoire et une hyperinsulinémie dès 4 semaines (Dubuc, 1976). À plus long terme les souris ob/ob développent également des dysfonctions myocardiques et des lésions athérosclérotiques, sans toutefois présenter d'hypertension (Van den Bergh *et al.*, 2007).

b. Souris db/db

La lignée de souris db/db est une lignée de souris obèses reposant sur la mutation du gène codant pour le récepteur à la leptine. Les souris deviennent obèses dès 6 semaines, et dès 8 semaines elles deviennent hyperglycémiques et dyslipidémiques. À 12 semaines elles deviennent hyperinsulinémiques, intolérantes au glucose et commencent à développer des dysfonctions cardiovasculaires, avec notamment l'apparition d'inflammation et de fibrose myocardique (Dong *et al.*, 2010).

c. Rats Zucker et Zucker Diabetic Fatty (ZDF)

Les rats Zucker sont homozygotes pour une mutation non fonctionnelle du gène codant pour les récepteurs à la leptine (fa/fa). Les rats Zucker sont particulièrement obèses et hyperphagiques dès le sevrage, à 4 semaines (Zucker and Zucker, 1996). Les rats prennent alors rapidement du poids et évoluent spontanément et rapidement d'un stade hyperinsulinémique et normoglycémique, avec déjà présence d'une insulino-résistance, à un stade hyperglycémique et insulino-déficient à 12 semaines (Etgen and Oldham, 2000). Ces animaux sont alors très dyslipidémiques et le tissu adipeux représente plus de 30% de leur masse corporelle totale (Zucker and Zucker, 1996). Les rats hétérozygotes (fa/+) sont minces et normoglycémiques et peuvent servir de contrôles aux rats fa/fa.

La lignée de rat ZDF (Zucker Diabetic Fatty) a été dérivée d'une lignée de rats Zucker fa/fa suite à l'apparition d'individus diabétiques non insulino-dépendants (Clark *et al.*, 1983). Les rats ZDF progressent irrémédiablement du stade pré diabétique au stade diabétique, mais le maintien des animaux sous un régime hypercalorique est conseillé afin d'améliorer la reproductibilité du phénotype au sein d'une population d'animaux. Ils deviennent hyperglycémiques à 7 semaines et tous les mâles obèses sont diabétiques à 12 semaines (Peterson *et al.*, 1990). Après 7 semaines l'insulinémie est très élevée

mais va rapidement décliner, les cellules β -pancréatiques présentant un défaut génétique chez les rats ZDF (Griffen *et al.*, 2001). De plus l'insulinorésistance des ZDF, causée par la mutation du récepteur à la leptine et l'obésité associée, est renforcée par une réduction de 25 à 55% du niveau de transporteurs du glucose GLUT4 (Slieker *et al.*, 1992).

7) Traitements

1. *Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2*

Le diabète de type 2 est défini par une glycémie supérieure à 7 mmol/L (1,26 g/L) après un jeûne de 8 heures. Il peut également causer des symptômes tels que la polyurie, la polydipsie ou un amaigrissement, tous liés à une glycémie supérieure à 2 g/L. Des complications micro vasculaires (rétinopathies, néphropathies et neuropathies), et macro vasculaires (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) accompagnent le diabète de type 2 et un contrôle de la glycémie permet de réduire la mortalité qui leur est associée.

L'HAS (Haute Autorité de Santé française) recommande des bonnes pratiques médicamenteuses afin d'assurer une meilleure prise en charge des patients. La metformine est recommandée en monothérapie en première intention et en l'absence de contre-indications. C'est également le médicament couramment prescrit pour la prévention du diabète de type 2 si des signes de résistance à l'insuline sont suspectés. En cas de contre-indications, la metformine peut être remplacée en première intention par un médicament de la classe des sulfamides hypoglycémifiants. Quel que soit le traitement donné en première intention des recommandations hygiéno-diététiques sont à suivre pour le patient et son taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) est surveillé au cours du traitement. Le pourcentage d'hémoglobine glyquée augmente lorsque la glycémie reste élevée pendant une période prolongée, ainsi les objectifs de traitement reposent principalement sur cette mesure plutôt que sur la diminution de la glycémie, plus ponctuelle. Les seuils d'hémoglobine glyquée à atteindre sont définis selon le profil

du patient mais d'une manière général l'objectif est d'obtenir un taux d'HbA1c inférieur à 7% (Tableau 2).

Profil du patient		HbA1c cible
Cas général	La plupart des patients avec DT2	≤ 7 %
	DT2 nouvellement diagnostiqué, dont l'espérance de vie est > 15 ans et sans antécédent cardio-vasculaire	≤ 6,5 % ¹
	DT2 : <ul style="list-style-type: none"> ■ avec comorbidité grave avérée et/ou une espérance de vie limitée (< 5 ans) ■ ou avec des complications macrovasculaires évoluées ■ ou ayant une longue durée d'évolution du diabète (> 10 ans) et pour lesquels la cible de 7 % s'avère difficile à atteindre car l'intensification médicamenteuse provoque des hypoglycémies sévères 	≤ 8 %
Personnes âgées	Dites « vigoureuses », dont l'espérance de vie est jugée satisfaisante	≤ 7 %
	Dites « fragiles », à l'état de santé intermédiaire et à risque de basculer dans la catégorie des malades	≤ 8 %
	Dites « malades », dépendantes, en mauvais état de santé en raison d'une polyopathie chronique évoluée génératrice de handicaps et d'un isolement social	< 9 % et/ou glycémies capillaires préprandiales entre 1 et 2 g/l
Patients avec antécédents (ATCD) cardio-vasculaires	Patients avec ATCD de complication macrovasculaire considérée comme non évoluée	≤ 7 %
	Patients avec ATCD de complication macrovasculaire considérée comme évoluée : <ul style="list-style-type: none"> ■ infarctus du myocarde (IDM) avec insuffisance cardiaque ■ atteinte coronarienne sévère (tronc commun ou atteinte tritonculaire ou atteinte de l'interventriculaire antérieur [IVA] proximal) ■ atteinte polyartérielle (au moins deux territoires artériels symptomatiques) ■ artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) symptomatique ■ accident vasculaire cérébral récent (< 6 mois) 	≤ 8 %
Patients avec insuffisance rénale chronique (IRC)	IRC modérée (stades 3A ² et 3B)	≤ 7 %
	IRC sévère ou terminale (stades 4 et 5)	≤ 8 %
Patientes enceintes ou envisageant de l'être	Avant d'envisager la grossesse	< 6,5 %
	Durant la grossesse	< 6,5 % et glycémies < 0,95 g/l à jeun et < 1,20 g/l en post-prandial à 2 heures

Tableau 2 : Objectifs de diminution du pourcentage d'hémoglobine glyquée pour le traitement de différents profils de patients diabétiques (Haute Autorité de Santé française).

Si l'objectif ne peut être atteint avec une monothérapie, un second médicament, d'une classe différente du premier est prescrit. Dans la plupart des cas la première ligne étant la metformine, le premier traitement proposé en complément sera un sulfamide tel que le glibenclamide. En cas d'intolérance celui-ci pourra être remplacé par une autre classe de médicament et si les différentes combinaisons possibles en bi ou même tri thérapie ne permettent pas un abaissement de l'HbA1c, le patient pourra en dernier recours se voir prescrire une insulinothérapie. Pour l'algorithme complet de la stratégie médicamenteuse à adopter chez les patients diabétiques de type 2 (Figure 18).

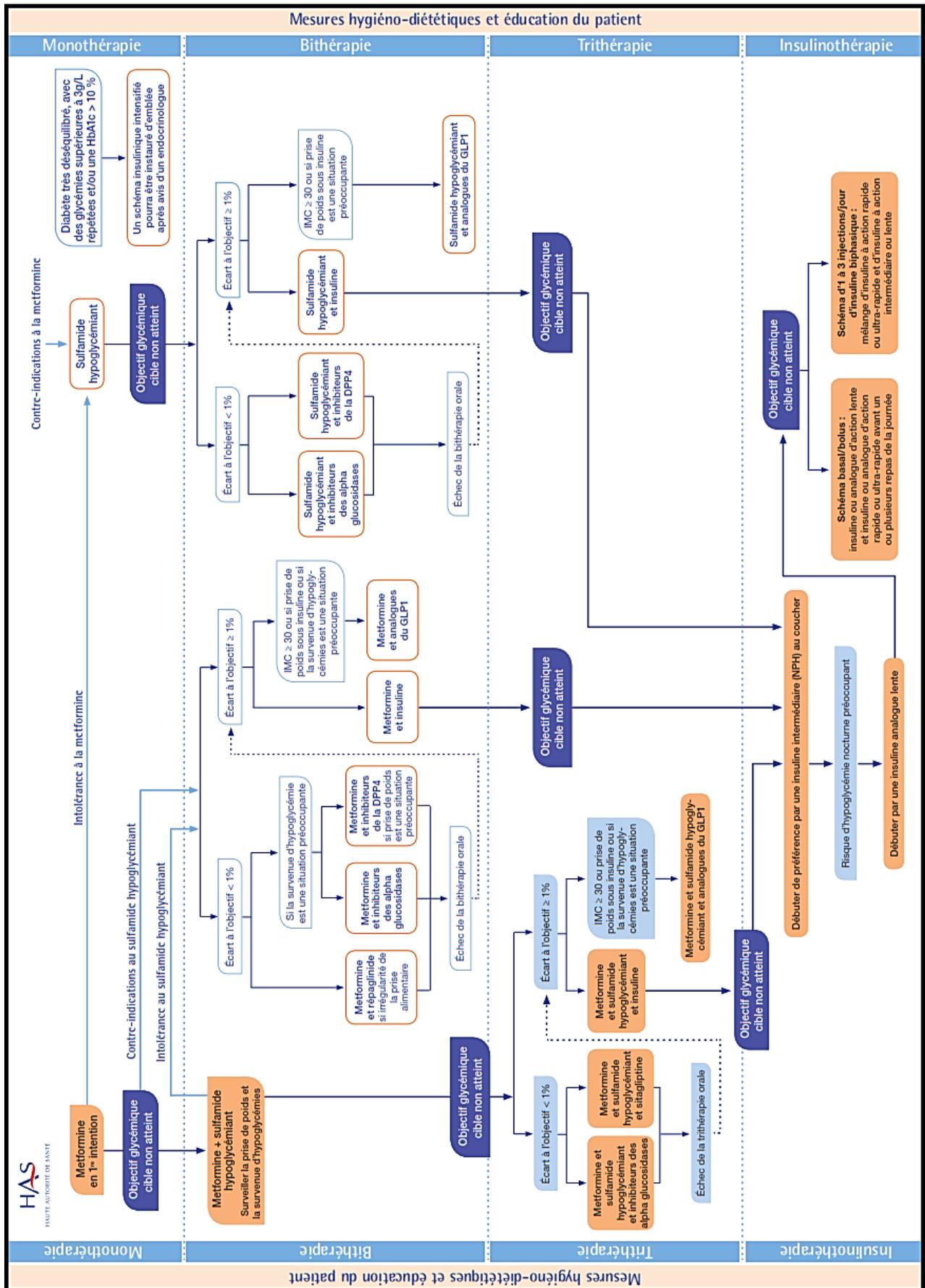


Figure 18 : Algorithme complet de la stratégie médicamenteuse à adopter chez les patients diabétiques de type 2 (Haute Autorité de Santé française).

2. Mesures hygiéno-diététiques

L'excès de poids est à l'origine de nombreux dysfonctionnements amenant une dérégulation de la signalisation de l'insuline. Les premières recommandations en cas de diabète sont la mise en place de mesures hygiéno-diététiques, avec notamment une surveillance du régime alimentaire, souvent dérégulé en apport calorique. Accompagnées d'une activité physique, même modérée, ces mesures vont permettre une perte de poids, et prévenir ou diminuer les problèmes d'hyperglycémie, de dyslipidémie mais aussi d'hypertension. Ce genre d'intervention permet ainsi de réduire les facteurs de risques cardiovasculaires chez les patients diabétiques mais aussi de diminuer la progression du pré-diabète vers le diabète (Balk *et al.*, 2015; Pastors *et al.*, 2002). Le type de sucres et de matières grasses consommées est également important pour le développement du diabète. Une ligne de conduite officielle a été élaborée et est soumise aux patients diabétiques (U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture, 2015). Basée sur de nombreuses études, elle met en avant les bénéfices d'un régime méditerranéen, pauvre en acides gras saturés, bénéfique à la fois pour le contrôle de la glycémie et pour la lipidémie. De plus les acides gras présents dans ce régime sont moins néfastes au niveau cardiovasculaire que les acides gras saturés. De la même façon les sucres raffinés et les boissons sucrées sont déconseillées au profit de sucres provenant de fruits et de légumes.

Par ailleurs, l'activité physique en elle-même permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline, alors que la sédentarité a un effet péjoratif (van der Berg *et al.*, 2016). Ainsi, la pratique d'une activité physique, même légère, interrompant un comportement sédentaire, est bénéfique et permet de diminuer la probabilité de voir apparaître un diabète de type 2 (Chastin *et al.*, 2015). Si des études ont montré que l'effort physique et l'effort nutritionnel sont proportionnels aux bénéfices obtenus sur la régression et la prévention du diabète, ils sont toutefois difficiles à maintenir sans une discipline et un suivi professionnel sur la durée. Ainsi le recours à des thérapies médicamenteuses est souvent nécessaire afin

d'empêcher l'installation du diabète ou le traitement d'une hyperglycémie ou d'une hypertension soutenue.

3. *Metformine*

En cas de diabète ou de pré-diabète le médicament de première ligne est la metformine. Elle a montré son efficacité dans la prévention du diabète et est particulièrement bien tolérée par les patients, même sur des durées de traitement pouvant atteindre dix ans (The Diabetes Prevention Program Research Group, 2012). La metformine fait partie de la classe des biguanides, une classe de médicaments dérivés de la guanidine ayant un effet anti-hyperglycémiant. Elle permet de réguler le métabolisme du glucose et la glycémie en diminuant la production de glucose endogène par le foie, mal contrôlée chez les patients insulino-résistants (Hundal *et al.*, 2000). Tous les mécanismes d'action de la metformine ne sont pas connus mais des études ont montré que son action passait notamment par la phosphorylation de l'AMPK et de CREBP pour inhiber la néoglucogenèse (Cho *et al.*, 2015; He *et al.*, 2009). Cette activation de l'AMPK ne se cantonne pas au foie et à la simple inhibition de la néoglucogenèse. L'AMPK ayant un rôle important dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, sa phosphorylation par la metformine va également augmenter l'oxydation des acides gras dans le foie mais aussi leur export *via* les VLDL (very Low Density Lipoproteins). Ces effets vont permettre de diminuer la quantité d'acides gras hépatiques, néfastes pour la sensibilité à l'insuline. Dans le muscle squelettique la phosphorylation de l'AMPK augmente la quantité de GLUT4 et l'activité de l'hexokinase, ce qui permet d'améliorer la captation et le stockage du glucose sanguin (Holmes *et al.*, 1999). Ainsi, si l'action principale de la metformine est l'inhibition de la néoglucogenèse, elle est capable également, par d'autres modes d'action, de diminuer la glycémie et d'améliorer la prise en charge du glucose sanguin (Cheng, 2005) (Figure 19).

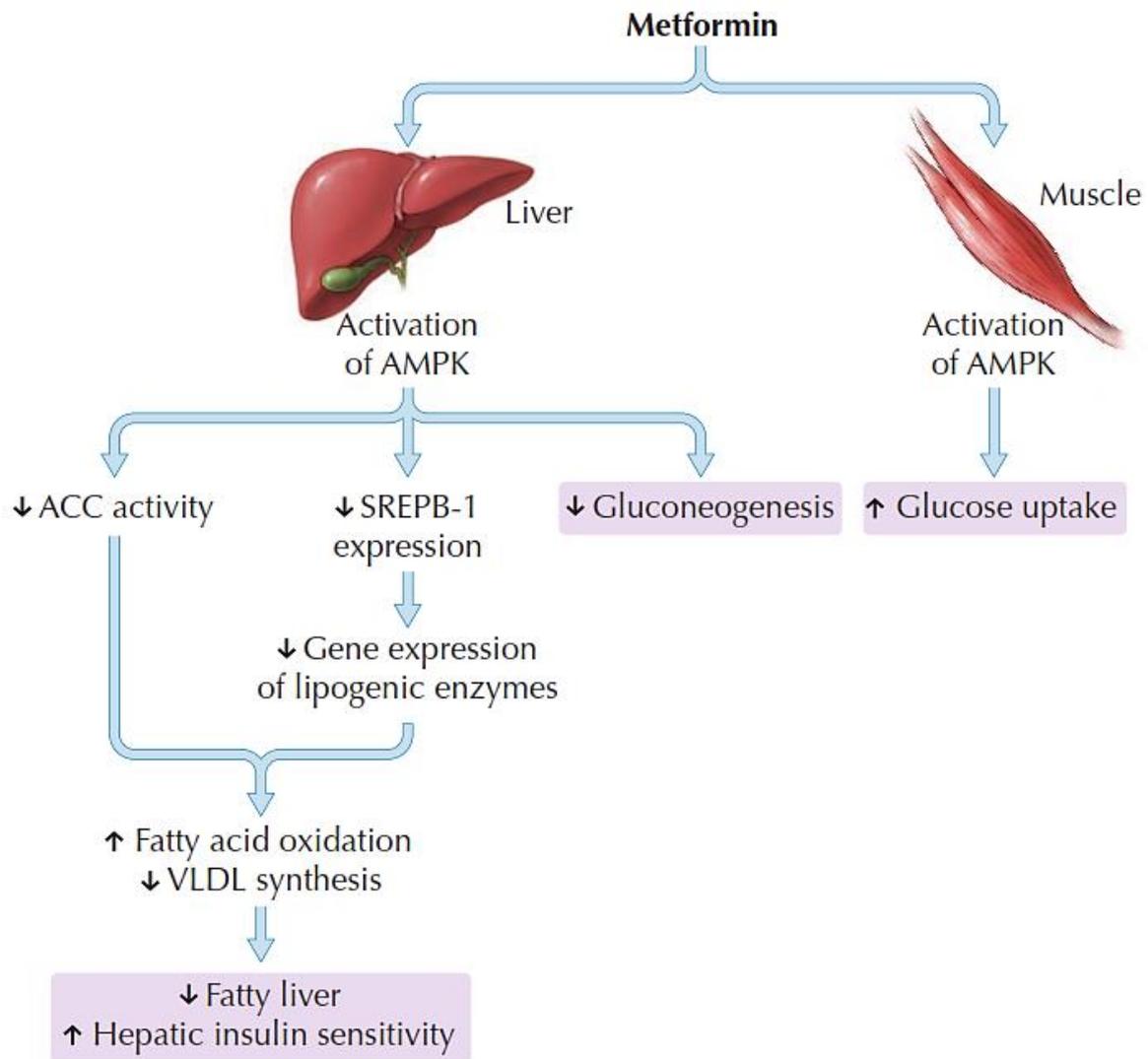


Figure 19 : Mécanismes d'action de la metformine (Cheng, 2005). La metformine active l'AMPK dans le foie et le muscle et améliore les métabolismes glucidique et lipidique dans le diabète de type 2. AMPK : adenosine monophosphate-activated protein kinase ; ACC : acetyl-CoA carboxylase ; SREBP-1 : sterol-regulatory-element-binding-protein-1 ; VLDL : very low density lipoprotein.

Les bénéfices de la metformine ont été évalués dans différentes études cliniques qui ont démontré son efficacité dans le contrôle de la glycémie, mais aussi sur la perte de poids et la réduction des risques cardiovasculaires accompagnant le diabète (Abbasi *et al.*, 2004, 1997; DeFronzo and Goodman, 1995). Étant bien tolérée, la metformine est ainsi prescrite rapidement à tout patient pré-diabétique mais aussi diabétique de type 2 avéré, avec dans ce second cas la possibilité d'une thérapie additionnelle issue d'une autre classe médicamenteuse.

4. Les thiazolidinédiones

Les thiazolidinédiones (TZD), ou glitazones, sont une classe de médicaments insulinosensibilisateurs apparus dans les années 1990 pour le traitement du diabète de type 2. Ils agissent en activant les PPAR- γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), des récepteurs nucléaires fortement impliqués dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique (Blaschke, 2006). L'activation des PPAR- γ induit l'expression de nombreux gènes permettant d'améliorer la sensibilité à l'insuline, avec notamment un effet important sur le tissu adipeux (Cheng, 2005). L'activation des PPAR- γ dans les adipocytes va en effet conduire à une diminution de la lipolyse et à une augmentation du stockage des acides gras. Par ailleurs, la sécrétion d'adiponectine est augmentée alors que la production de

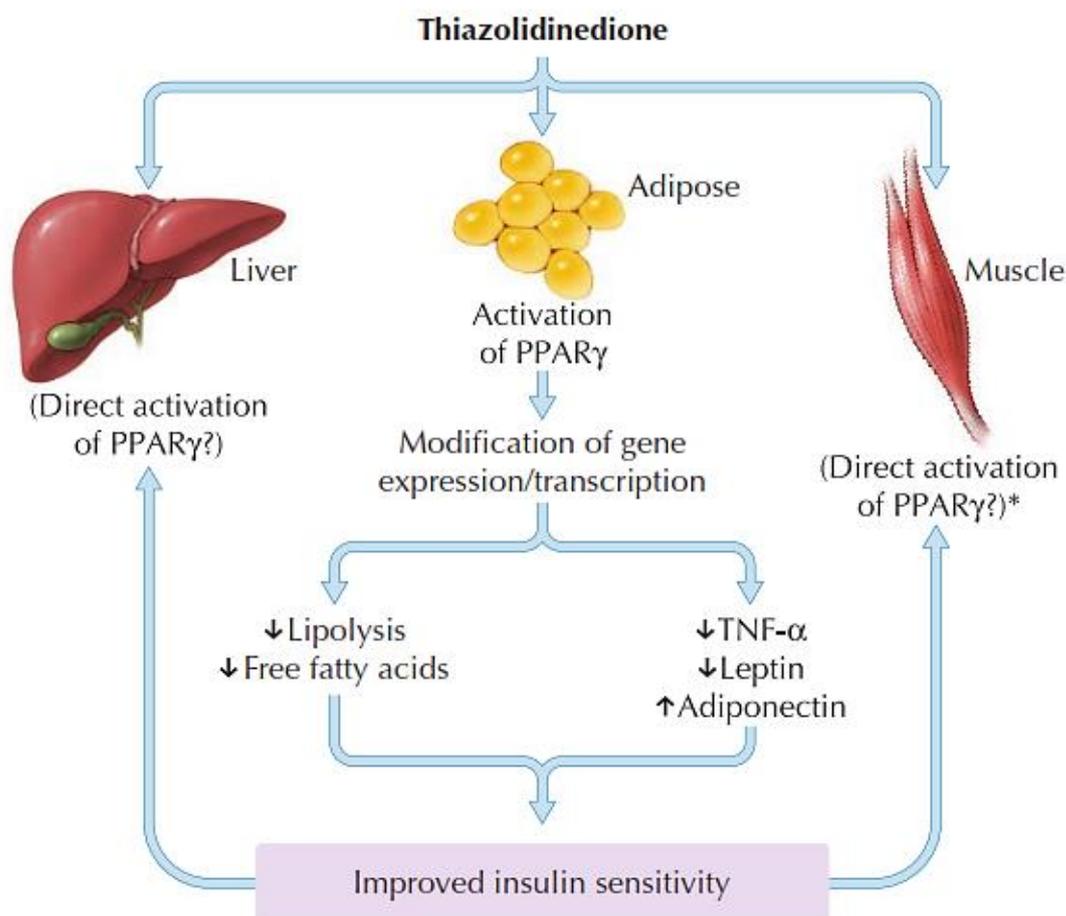


Figure 20 : Mécanismes d'action des thiazolidinédiones (Cheng, 2005). Les thiazolidinédiones activent PPAR γ à la fois dans le foie, le tissu adipeux et le muscle pour améliorer la sensibilité à l'insuline. PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ; TNF- α : tumour necrosis factor- α .

TNF- α est diminuée. Ensemble ces modifications vont améliorer la sensibilité à l'insuline générale et donc améliorer le métabolisme du muscle squelettique et du foie (Figure 20) (Cheng, 2005).

La rosiglitazone et la pioglitazone sont les deux principales molécules de la classe des TZD qui ont été commercialisées. Différents essais cliniques ont permis de montrer de bons résultats dans le traitement de patients diabétiques. Les deux TZD permettent de diminuer la glycémie et les acides gras circulants, mais aussi de diminuer la sécrétion d'albumine dans les urines, témoin de dommages rénaux chez le patient diabétique (Aronoff *et al.*, 2000; Herz *et al.*, 2003; Lebovitz *et al.*, 2001).

Grâce à leur efficacité, la rosiglitazone et la pioglitazone ont longtemps été prescrites, seules ou en association avec d'autres thérapeutiques, pour le traitement du diabète de type 2. Cependant, des études prospectives ont montré à long terme un rapport bénéfice/risque défavorable pour ces molécules. En effet, la rosiglitazone a été associée à une augmentation importante du risque d'accidents cardiovasculaires et notamment d'infarctus du myocarde (Graham *et al.*, 2010; Home *et al.*, 2009; Nissen and Wolski, 2010). Elle a ainsi été retirée du marché en Europe en 2010 et sa prescription a été fortement restreinte aux États-Unis. La pioglitazone, quant à elle, est plus favorable que la rosiglitazone sur le plan cardiovasculaire, mais sa prescription a été associée à une augmentation du risque d'apparition du cancer de la vessie dans une étude randomisée (Caisse nationale de l'assurance maladie, Paris, France, 2011). Elle a alors été retirée du marché en France en 2011, puis en Allemagne, et restreinte de prescription aux États-Unis suite à différentes études corroborant ces résultats (Ferwana *et al.*, 2013; Tuccori *et al.*, 2016).

5. Inhibiteurs de l' α -glucosidase

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont des molécules agissant sur les enzymes de la barrière intestinale responsables de la dégradation des polysaccharides en monosaccharides absorbables par l'intestin. Ils permettent de retarder l'absorption des glucides par l'intestin et ainsi de diminuer la glycémie

postprandiale. La diminution de la glycémie à jeun reste cependant modeste (Bayraktar *et al.*, 1996). Cette classe de médicaments n'est ainsi pas recommandée en traitement de première intention, elle sera prescrite plutôt en complément d'autres anti-hyperglycémiques oraux. Par ailleurs, les inhibiteurs de l' α -glucosidase causent des effets indésirables de type gastro-intestinaux (ballonnements, flatulences, diarrhées, douleurs abdominales) chez environ 20% des patients (Chiasson *et al.*, 2002).

6. Sécrétagogues de l'insuline

Les sécrétagogues de l'insuline sont des molécules ayant pour effet la stimulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Ils sont divisés en deux catégories, les sulfonylurées et les non-sulfonylurées.

a. Les sulfamides ou sulfonylurées

Les sulfonylurées agissent sur la production d'insuline en se fixant directement sur leurs récepteurs à la surface des cellules β -pancréatiques, sur le canal potassique. Cette fixation provoque la fermeture des canaux potassiques,

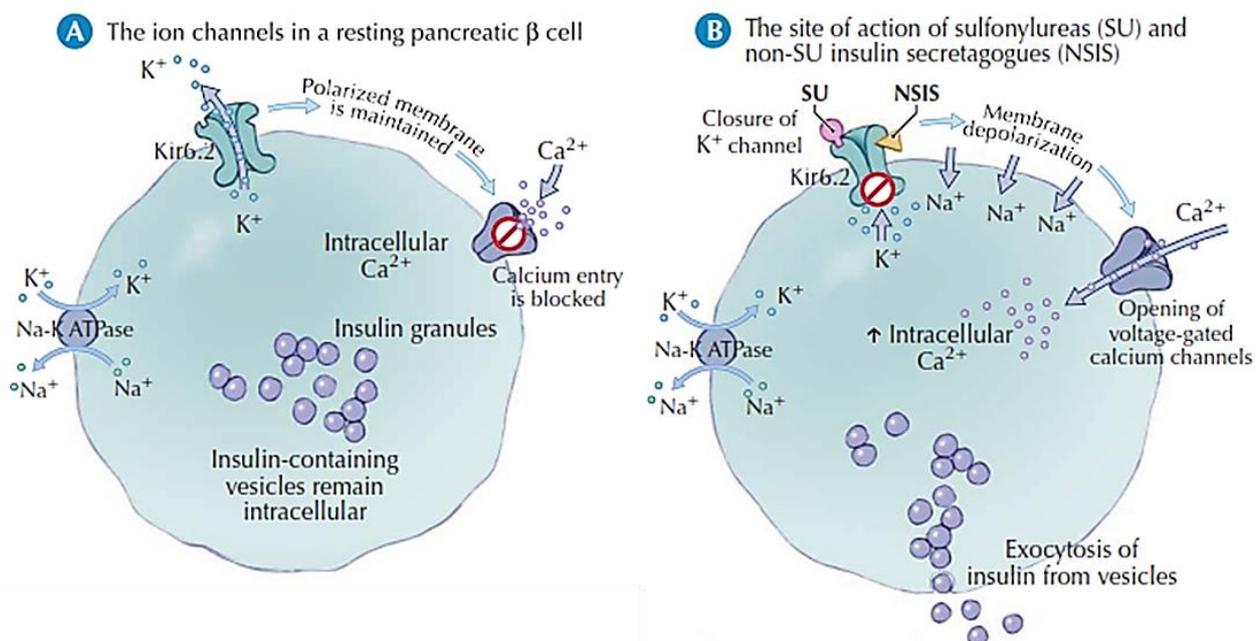


Figure 21 : Mécanisme d'action des sécrétagogues de l'insuline (Cheng, 2005). Les sécrétagogues de l'insuline miment l'action du glucose dans les cellules β en induisant la fermeture des canaux potassiques, permettant la dépolarisation de la membrane et l'entrée de calcium dans la cellule, conduisant à l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

normalement ouverts en condition de "repos pancréatique" afin de maintenir la polarisation de la membrane de la cellule β -pancréatique. La dépolarisation de la membrane par la fixation des sulfonyles cause l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendant, augmentant la concentration intracellulaire en calcium, et provoquant ainsi l'exocytose des vésicules d'insuline (Figure 21) (Cheng, 2005).

Les molécules de cette classe actuellement utilisées sont la glipizide, la glicazide et le glibenclamide. Les différents sulfonyles utilisés seuls permettent une réduction moyenne de l'hémoglobine glyquée de 1 à 1,5 % (Dills *et al.*, 1996; Tessier *et al.*, 1994). Les principaux effets secondaires des sulfonyles sont une prise de poids et des passages d'hypoglycémie (Zimmerman, 1997). En effet l'augmentation de la sécrétion d'insuline indépendamment des variations de la glycémie peut causer des épisodes d'hypoglycémie à jeun. Toutefois ces épisodes restent modérés et sont facilement ajustables par la prise d'aliments sucrés. Si l'ensemble des mécanismes de la prise de poids ne peuvent être expliqués, il semblerait que les passages hypoglycémiques soient en cause (Lebovitz *et al.*, 2001). En effet une hypoglycémie, même légère mais soutenue, peut favoriser l'appétit et sur la durée conduire à une prise de poids.

b. Les non-sulfonyles

Le mécanisme d'action des non-sulfonyles est très similaire à celui des sulfonyles. Ils se fixent sur le même récepteur, mais sur un site de fixation différent. De plus, leur vitesse d'action est plus importante et leur demi-vie est plus courte, la stimulation de la production d'insuline consécutive à la prise du médicament est ainsi plus rapide, mais aussi plus brève qu'avec les sulfonyles (Hatorp, 2002; McLeod, 2004). Les principaux représentants de cette classe sont la repaglinide et la nateglinide. Grâce à leur cinétique d'action rapide, ils sont conseillés pour une prise pendant le repas, permettent ainsi un bon contrôle de la glycémie postprandiale (Hanefeld *et al.*, 2000). Les effets secondaires des non-sulfonyles sont, comme avec les sulfonyles, l'hypoglycémie et la prise de poids. Toutefois leur mode d'action transitoire rend ces effets secondaires relativement marginaux (McLeod, 2004).

7. Inhibiteurs de SGLT2

Les inhibiteurs de SGLT2 (Sodium Glucose Linked Transporter 2), ou gliflozines, appartiennent à une classe de médicaments antidiabétiques apparus dans les années 2010 dans laquelle se retrouvent la canagliflozine, la dapagliflozine et l'empagliflozine. Les gliflozines diminuent la réabsorption rénale du glucose, permettant ainsi une baisse de la glycémie et une augmentation de l'excrétion urinaire du glucose. De manière indirecte elles permettent également d'induire une perte de poids et une diminution de la pression artérielle (Neal *et al.*, 2013; Shubrook *et al.*, 2015). Les données de différents essais cliniques ont montré la pertinence de ces effets bénéfiques et leur persistance sur plusieurs dizaines de semaines de traitement (Fujita and Inagaki, 2014; Vasilakou *et al.*, 2013). La synthèse de ces études a démontré la supériorité des gliflozines sur les sulfonylurées, mais aussi que la dapagliflozine était la plus prometteuse (Nauck *et al.*, 2011).

Toutefois, bien que ces médicaments aient obtenu une autorisation d'utilisation en clinique, l'étude de leurs effets secondaires se poursuit, avec application d'un principe de précaution. Tout d'abord, les gliflozines, en augmentant la concentration en glucose dans les urines, favorisent l'apparition d'infections du tractus urinaire et génital chez certains patients (Stenlöf *et al.*, 2013; Strojek *et al.*, 2011). De plus, la survenue de cancers de la vessie et du sein a été mise en évidence dans certaines méta-analyses concernant la dapagliflozine (Riser Taylor and Harris, 2013). Des études ont également mis en évidence une augmentation de la survenue d'évènements cardiovasculaires chez les patients traités par la dapagliflozine par rapport aux patients prenant le placebo (Vasilakou *et al.*, 2013). Les résultats de ces différentes méta-analyses ont ainsi entraîné un renforcement de la pharmacovigilance sur cette classe de médicaments et de nombreuses études sont en cours afin d'affirmer ou d'infirmer ces risques. En 2016 la FDA (Food and Drug Administration) a effectué plusieurs communiqués afin d'attirer l'attention sur d'importants risques d'acidocétose et d'insuffisance rénale mis en évidence par des résultats intermédiaires d'études cliniques en cours (U.S. Food and Drug Administration, 2016c, 2016b, 2016a).

8) Présentation de l'étude

Le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose ou 6DIG est un analogue du glucose, radiomarqué à l'iode 123 (R_γ : 159 keV, $T_{1/2}$: 13,2h) ou 125 (R_γ : 27 keV, $T_{1/2}$: 59,9j), et permettant d'évaluer le transport du glucose dans des organes d'intérêt (Perret *et al.*, 2007). L'évaluation de la résistance cardiaque à l'insuline est possible grâce au calcul d'un index R, qui nécessite l'obtention de la cinétique sanguine du traceur ainsi que de sa cinétique tissulaire (Briat *et al.*, 2007). Chez le petit animal l'obtention de ces cinétiques passe par un scan thoracique continu, jusque-là en 2 dimensions, et des prélèvements sanguins réguliers (Vollaire, 2010).

Cette technique de mesure de l'insulinorésistance myocardique en imagerie nucléaire chez le petit animal présente un intérêt majeur dans le secteur pharmaceutique, pour l'étude de nouveaux médicaments insulinosensibilisateurs. En effet, elle permet de réaliser des études de suivi longitudinal dans différentes conditions physiologiques ou physiopathologiques. Toutefois, la technique proposée (Briat *et al.*, 2007), si elle permet l'obtention de résultats très informatifs, reste beaucoup trop invasive, notamment avec la pose de cathéters pour les prélèvements sanguins, et l'utilisation d'un anesthésique mal adapté aux études de suivi longitudinal, qui nécessitent des réveils et des anesthésies répétées de l'animal.

L'objectif de cette étude a été d'optimiser le protocole de mesure de l'insulinorésistance cardiaque, afin de le rendre le moins invasif possible.

Dans la première partie de l'étude, la possibilité du portage de la technique en imagerie 3D a été évaluée. L'apport principal de ce changement de modalité est de permettre la quantification précise de la captation du 6DIG dans le compartiment myocardique et également d'identifier un compartiment sanguin afin d'obtenir une cinétique sanguine sans recourir aux prélèvements.

Dans une deuxième partie, la sensibilité de la nouvelle méthode de mesure en imagerie 3D a été évaluée grâce au suivi de l'évolution de l'index de résistance à l'insuline, chez des animaux obèses, en réponse à un traitement insulinosensibilisateur. Enfin, dans une dernière partie, des optimisations de la

technique ont été évaluées afin d'essayer de répondre à deux problématiques méthodologiques.

La première concerne la pose de cathéters par voie veineuse jugulaire ou fémorale. Ce geste n'est pas sans risque pour l'animal et nécessite un certain temps d'apprentissage et de mise en œuvre. Selon l'expérience de l'expérimentateur, mais aussi l'état de santé de l'animal, la durée de l'intervention et donc de l'anesthésie peut varier. Ainsi des complications peuvent survenir, compromettant le bon déroulement des expérimentations, leur reproductibilité, mais aussi le bien-être de l'animal. De plus, l'un des objectifs de ces travaux est de proposer une méthode permettant un suivi longitudinal. La pose d'un cathéter dans la veine de la queue, retirable avant le réveil de l'animal, serait l'alternative idéale. Elle a donc été évaluée dans cette partie de l'étude.

La seconde concerne le mode d'anesthésie utilisé. Le pentobarbital présente certains avantages, notamment une absence d'interaction avec le métabolisme glucidique, un point important pour ce protocole (Zuurbier *et al.*, 2008). Toutefois une anesthésie longue au pentobarbital nécessite des injections répétées (toutes les 40 minutes environ) et le réveil est particulièrement long. Des détresses respiratoires peuvent également survenir, notamment dues à la formation de glaires dans la trachée de l'animal. Les pertes liées à ce mode d'anesthésie ne sont donc pas négligeables. L'usage d'anesthésiques gazeux présente de nombreux avantages par rapport au pentobarbital. L'induction de l'anesthésie est en effet plus rapide et moins variable selon les animaux, l'entretien de l'anesthésie est simple et le réveil est rapide. Ensemble, ces avantages permettraient de diminuer la mortalité liée à l'anesthésie et rendraient la technique plus simple à mettre en œuvre. Le remplacement du pentobarbital par l'isoflurane a été évalué dans cette dernière partie, après une évaluation des effets hyperglycémiques potentiels de ce dernier.

II. Matériel et méthodes expérimentales

1) Validation de la technique de mesure de l'IR de manière non invasive

1. Modèle animal

Le protocole d'expérimentation a été préalablement validé par le comité d'éthique local (n°12, Com-Eth Grenoble) et autorisé par le ministère (#02845.02). La validation de la méthode en imagerie SPECT a été réalisée avec des rats standards Wistar (n=6, 299,3 ± 55,0 g, Charles River, France) et des rats obèses Zucker *fa/fa*, âgés de 11 semaines et donc insulino-résistants (n=6, 467,3 ± 34,4 g, Charles River, France). Les animaux sont gardés en animalerie conventionnelle et nourris avec un régime standard *ad libitum*. Les animaux sont mis à jeun la nuit précédant chaque protocole d'imagerie avec le 6DIG.

2. Préparation du traceur

Le [¹²⁷I]-6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose ou 6DIG est fourni par la société ERAS Labo (St Nazaire les Eymes, France). Sa synthèse est réalisée à partir du 6-déoxy-6-iodo-1, 2, 3, 4-tetra-O-acétyl-β-D-glucopyranose par désacétylation (Bignan *et al.*, 1993). Le 6DIG peut être marqué soit avec de l'iode 123, d'une demi-vie de 13,2 heures, soit avec de l'iode 125, d'une demi-vie de 59,9 jours.

Le radiomarquage est réalisé par la méthode d'échange isotopique ^{*}I/¹²⁷I (Mathieu, 1982), légèrement modifiée comme suit : 5 mg de 6DIG sont dissous dans 1 ml d'une solution de Na¹²⁷I (4 µg/mL) dans l'acétone. On ajoute à ce mélange environ 185 MBq de la solution radioactive d'iodure de sodium (Na¹²⁵I (Perkin Elmer) ou Na ¹²³I (IBA molecular)). Le mélange est ensuite chauffé à 95°C pendant une heure. Après refroidissement à 70°C, l'acétone est éliminée par évaporation. Le 6DIG est ensuite dissous dans 1 ml de NaCl (0,9%). En fin de marquage les iodures libres représentent environ 10 à 15% de l'activité mesurée, il est alors nécessaire de purifier ce produit afin de les éliminer. Pour cela la solution est passée sur une colonne échangeuse d'anions (OASIS Max, 1 mL, 30 mg, Waters) préalablement activée par un passage de méthanol et équilibrée avec du NaCl

0,9%. Le 6DIG est ensuite analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'une colonne C18 (Shimadzu, ODS2 Spherisorb 4,6 x 150 mm, Waters) avec une phase mobile en H₂O pure avec un débit de 1 mL/min. La détection est faite par un radiodétecteur et un détecteur UV à 254 nm.

La stabilité de la molécule est évaluée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Shimadzu, phase solide RP18, éluant : eau, débit : 7 mL/min). La molécule marquée à l'iode 125 reste stable *in vitro* pendant 60 jours (Figure 22) (Vollaire, 2010). Cette bonne stabilité dans le temps permet d'utiliser indifféremment l'iode 125 à la place de l'iode 123 et ainsi éviter les radiomarquages fréquents.

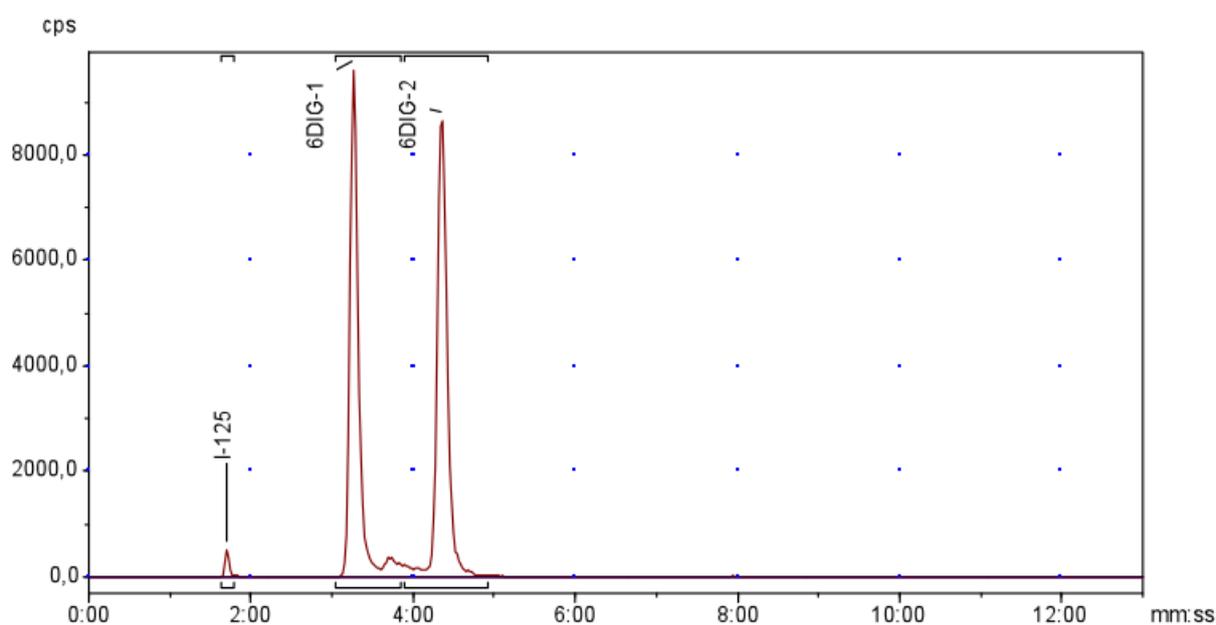


Figure 22 : Profil HPLC du 6DIG 60 jours après marquage. Les 2 pics sont caractéristiques du 6DIG et représentent les 2 anomères de la molécule de glucose, alpha et beta.

La stabilité du 6DIG dans le sang et les urines a été étudiée 45 minutes après injection du traceur chez le rat (Figure 23) (Vollaire, 2010). La proportion d'iode libre est d'environ 5% dans les urines et 11% dans le sang à environ 45 minutes après injection, mais le 6DIG n'est pas modifié. Les résultats de stabilité sont identiques pour le 6DIG radiomarqué à l'iode 123 ou 125. Quel que soit l'isotope utilisé pour le radiomarquage la stabilité et la pureté radiochimique de la molécule sont toutefois vérifiées après chaque radiomarquage.

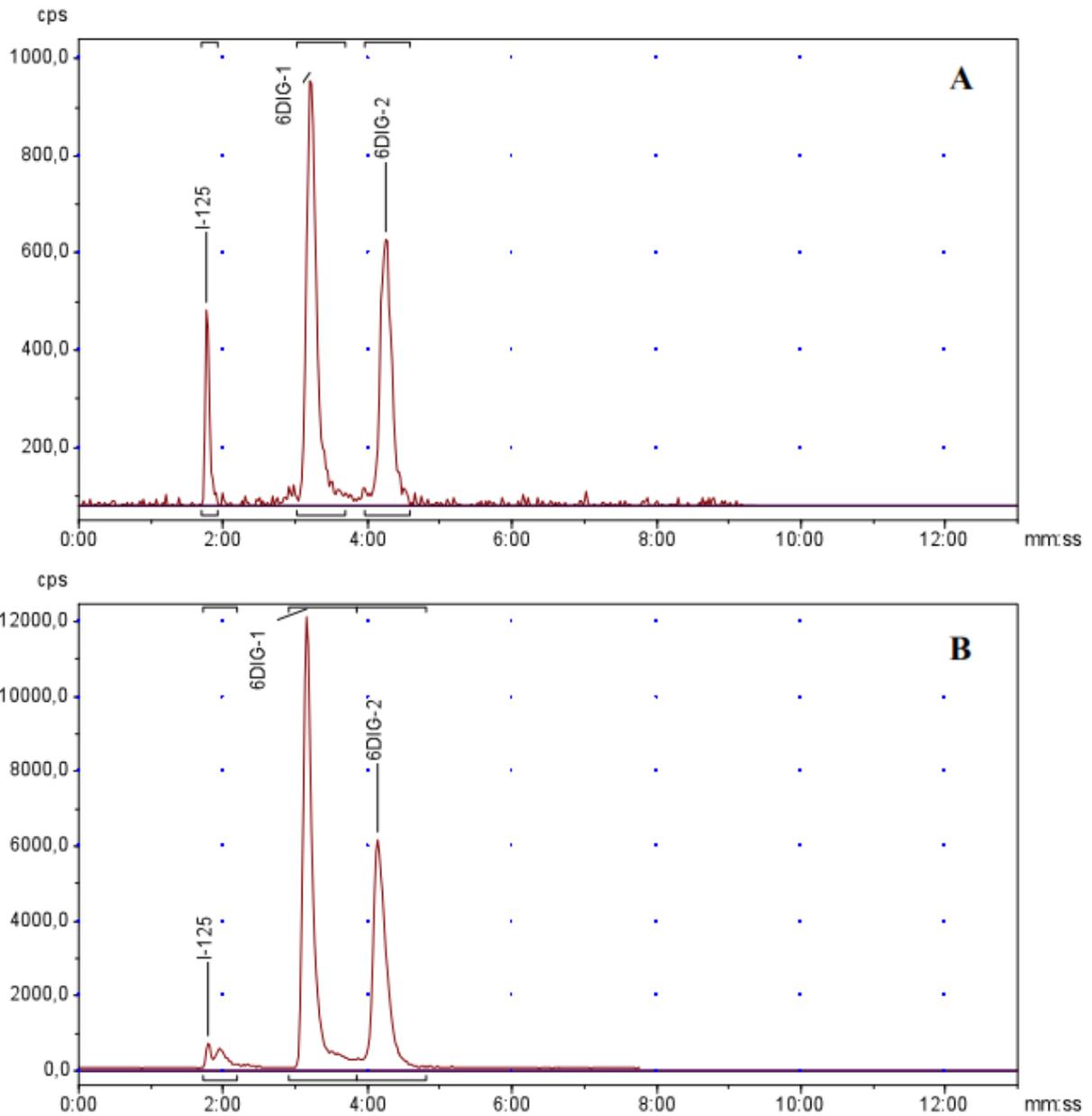


Figure 23 : Stabilité du 6DIG 45 minutes après injection. A) dans le sang, B) dans l'urine.

3. Imagerie SPECT

Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (54,7 mg/kg, Ceva santé animale). Deux cathéters en polyuréthane (0,61 mm de diamètre, Portex, UK) sont posés : l'un dans la veine fémorale pour les injections de 6DIG et d'insuline sous forme de bolus, et l'autre dans l'artère fémorale pour les prélèvements sanguins. Les cathéters sont

préalablement remplis d'une solution saline héparinée (NaCl 0,9 %, héparine Choay, 5000 UI/mL), et sont rincés avec cette même solution après chaque bolus. Durant toute l'étape de "chirurgie" la température du rat est contrôlée et stabilisée grâce à un tapis chauffant relié à une sonde rectale (Homeothermic blanket control unit, Harvard Apparatus, UK).

Les rats sont ensuite installés dans le lit thermostaté de la caméra dédiée au petit animal (NanoSPECT-CT, Bioscan/Medisco), ils reçoivent un mélange air/oxygène (1:1) et leur respiration est monitorée tout au long de l'acquisition. La glycémie est mesurée en condition basale grâce à une goutte de sang prélevée à l'extrémité de la queue (Accu-Chek, Roche, France).

Un bolus de 6DIG (~37 MBq) est injecté simultanément au démarrage de l'acquisition des images (24 projections, 10 sec/projection), centrée sur la région thoracique de l'animal. Après 20 minutes d'acquisition de la radioactivité, un bolus d'insuline est injecté (2,5 UI/kg, Actrapid, Novo Nordisk, France). Cinq minutes plus tard un deuxième bolus de 6DIG (~37 MBq) est injecté, suivi par une nouvelle phase d'acquisition de 20 minutes (Figure 24). Des prélèvements sanguins (2 gouttes après élimination des 2 premières gouttes) sont réalisés, à différents temps après les injections de 6DIG (30", 1'30", 2', 2'30", 3', 3'30", 4', 5', 7', 10', 15', 20') grâce au cathéter artériel.

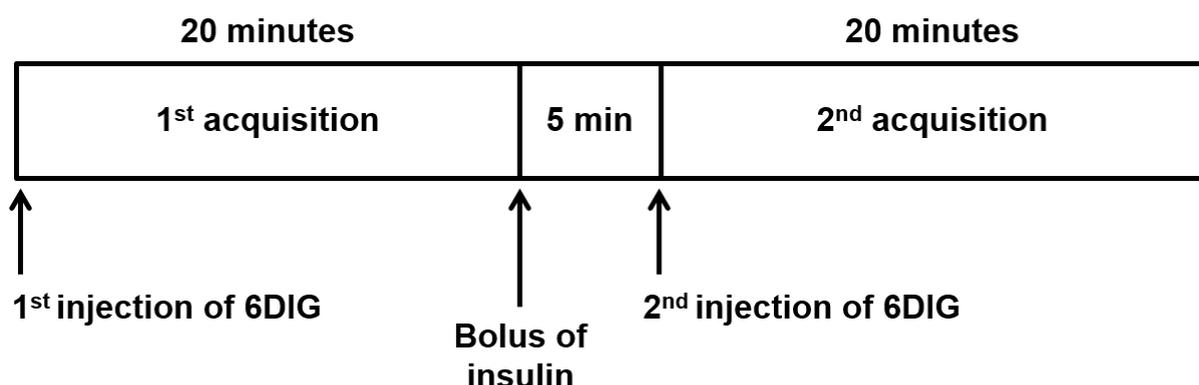


Figure 24 : Protocole expérimental d'imagerie SPECT avec le 6DIG.

À la fin de l'acquisition SPECT, une acquisition CT (Computed Tomography, scanner à rayons X ; 45 kvp, 180 projections, 500 ms par projection) est réalisée simultanément à une infusion intraveineuse d'un produit de contraste (Hexabrix,

320 mg/mL, Guerbet, France ; environ 1 mL en infusion sur 1 minute). La glycémie est alors à nouveau mesurée et l'animal est sacrifié par une injection intraveineuse létale de pentobarbital.

Les acquisitions SPECT et CT sont reconstruites grâce au logiciel Vivoquant (InviCRO, Boston USA). Les images CT tridimensionnelles ainsi obtenues renseignent sur l'anatomie du rat et permettent de tracer des volumes d'intérêt (VOI) sur le cœur : myocarde, ventricule droit (VD) et ventricule gauche (VG).

La cinétique sanguine du traceur est alors estimée grâce à la quantification des images SPECT pour des VOI tracées dans les cavités cardiaques (ventricules gauche et/ou droit). Cette cinétique est également évaluée par la mesure de la radioactivité, grâce à un compteur gamma (Wizard², Perkin Elmer, USA), dans les échantillons de sang obtenus par prélèvements. La cinétique myocardique est quant à elle évaluée par la quantification de l'activité dans des VOI myocardiques sur les images SPECT. Grâce à ces cinétiques, il est possible de calculer 4 index R différents selon le choix de la VOI pour la cinétique sanguine : VG, VD, VD+VG ou prélèvements sanguins.

4. *Modélisation mathématique*

Les cinétiques obtenues après quantification des images sont traitées grâce au logiciel de modélisation mathématique SAAM (Simulation Analysis And Modeling Institute, University of Washington, USA). Tout d'abord, les cinétiques sanguines et myocardiques sous insuline sont corrigées de l'activité résiduelle de la première injection de 6DIG. Pour cela les cinétiques sanguines et myocardiques en conditions basales sont ajustées par une double exponentielle, grâce au module *numerical* du logiciel SAAM. Les données sont alors extrapolées jusqu'à 45 minutes et sont retranchées aux données expérimentales obtenues après injection de l'insuline.

L'analyse de ces données cinétiques nécessite l'utilisation d'un modèle mathématique à 3 compartiments (cœur, sang et tissus périphériques), précédemment mis au point au laboratoire par Lotfi Slimani (Figure 25) (Slimani *et al.*, 2002). Ce modèle comporte une fonction d'entrée dans le compartiment sanguin (ex_1 , l'injection du traceur), et deux fonctions d'observation, l'une au niveau du compartiment sanguin (s_1 , la mesure de l'activité sanguine au cours du temps), et l'autre au niveau du compartiment cardiaque (s_2 , l'activité myocardique au cours du temps). Les constantes k sont les coefficients de transfert entre les différents compartiments et représentent le transport du glucose entre ces derniers. Les constantes $k(2,1)$ et $k(1,2)$ représentent les coefficients de transfert du traceur entre le compartiment sanguin et le compartiment myocardique, alors que les constantes $k(3,1)$ et $k(1,3)$ représentent les coefficients de transfert entre le compartiment sanguin et les tissus périphériques. La constante $k(0,1)$, quant à elle, représente une fuite irréversible du traceur, notamment par le système d'élimination urinaire ou la captation hépatique.

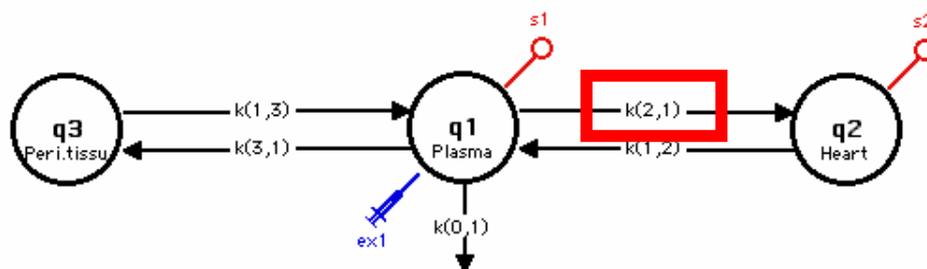


Figure 25 : Modélisation mathématique compartimentale du transport du 6DIG. Les compartiments q_1 , q_2 et q_3 représentent la circulation sanguine, le cœur et les tissus périphériques respectivement. $k(x,y)$ représentent les coefficients de transfert du 6DIG entre chaque compartiments. $k(2,1)$ est le coefficient de transfert représentant l'entrée du traceur du sang vers le cœur. "ex1" représente l'injection intraveineuse du traceur.

Nous nous intéressons ici plus particulièrement à $k(2,1)$, le coefficient d'entrée du traceur du sang vers le myocarde. Le modèle, géré grâce au module *compartmental* de SAAM, permet de calculer les coefficients de transfert du traceur entre les différents compartiments. Il permet d'obtenir pour chaque coefficient de transfert une estimation moyenne du paramètre, associée à un écart type et un coefficient de variation. Les paramètres estimés sont jugés acceptables quand les coefficients de variation sont les plus faibles possibles, avec pour limite

la valeur de 50%. L'index d'insulinorésistance R est alors calculé avec la formule suivante :

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

L'index R compare l'entrée du traceur dans le compartiment myocardique en condition basale et après stimulation sous insuline. Plus l'individu est sensible à l'insuline, plus le transport du traceur sera augmenté, et donc plus R sera élevé.

5. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel Medcalc (Medcalc Software). Les tests non paramétriques de Wilcoxon & Friedman et Mann-Whitney sont utilisés pour évaluer les différences statistiques entre valeurs appariées et non-appariées, respectivement. Une différence est considérée comme statistiquement significative lorsque $p < 0,05$. La comparaison des différents moyens de calcul de R est réalisée grâce à des graphiques de Bland-Altman.

2) Sensibilité de la mesure non invasive de l'index R

Le protocole d'expérimentation a été préalablement validé par le comité d'éthique local (n°12, Com-Eth Grenoble) et autorisé par le ministère (#02845.02). L'évaluation de la sensibilité de la méthode est réalisée avec des rats obèses Zucker *fafa*, âgés de 11 semaines et donc insulinorésistants (n=14, 379,7 \pm 27,3g). Les animaux sont gardés en animalerie conventionnelle et nourris avec un régime standard *ad libitum*. Ces animaux sont traités, ou non, par un insulinosensibilisateur de la famille des thiazolidinédiones, la rosiglitazone.

Les rats sont séparés de façon aléatoire en 2 groupes : un groupe de rats traités à la rosiglitazone par gavage oral (rosiglitazone, Euromedex, poudre dissoute dans l'eau, 5 mg/kg/jour, n=8) et un groupe de rats recevant un placebo (eau, n=6). La mesure de l'index R est réalisée 2 fois, à 2 semaines d'intervalle, avant et après traitement (Figure 26). Les animaux sont mis à jeun la nuit précédant chaque protocole 6DIG.



Figure 26 : Protocole d'étude pour l'évaluation de la sensibilité de la méthode de mesure de l'index d'insulinorésistance.

Le jour du protocole 6DIG, les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (54,7 mg/kg). Un cathéter en polyuréthane (0,61 mm de diamètre, Portex) est posé dans la veine jugulaire pour les injections de 6DIG et d'insuline. Le cathéter est préalablement rempli d'une solution saline héparinée (NaCl 0,9 %, héparine Choay, 5000 UI/mL) et rincé par cette même solution après chaque bolus. Le cathéter est ensuite "tunnelisé" sous la peau et ressorti entre les omoplates du rat. Durant toute l'étape de "chirurgie" la température du rat est contrôlée et stabilisée grâce à un tapis chauffant relié à une sonde rectale (Homeothermic blanket control unit, Harvard Apparatus, UK).

La procédure d'acquisition est identique à celle précédemment décrite, à l'exception des prélèvements sanguins, ici non effectués. À la fin de la procédure d'acquisition les rats sont réveillés et placés en animalerie en cage individuelle. Pendant 13 jours les rats recevront en gavage oral, soit la rosiglitazone, soit le placebo en volume équivalent. Le gavage commence le surlendemain de la première acquisition afin de laisser le temps aux animaux de se remettre de la pose des cathéters et de l'anesthésie.

Pour la deuxième acquisition, les cathéters veineux étant très fréquemment bouchés ou rongés et la plupart du temps inutilisables, de nouveaux cathéters sont

placés dans la veine fémorale selon le protocole décrit précédemment. Les animaux sont placés dans la caméra et les acquisitions ont lieu de la même manière que précédemment, avant le traitement. À la fin de ce protocole, les rats sont euthanasiés par une injection intraveineuse létale de pentobarbital. Les protocoles de traitement d'images et des données sont identiques à ceux précédemment décrites (page 66).

3) Essais d'optimisation de la méthode

1. Injection en veine caudale

L'évaluation de l'effet du changement de site de l'injection est réalisée avec des rats Wistar sains (n=24, 348,4 ± 61,7g, Charles River, France). La méthode générale reste la même que pour la partie I, à l'exception du site d'injection. En effet, les injections sont réalisées cette fois par l'intermédiaire d'un cathéter à ailette (24G, BD Insyte) placé dans l'une des veines latérales caudales.

2. Méthode d'anesthésie

L'évolution de la glycémie après une anesthésie à l'isoflurane a été évaluée. Pour cela, des rats Wistar (n=2) et Zucker (n=2), à jeun, ont été anesthésiés à l'isoflurane (1,5% dans un mélange oxygène/air 1:1) pendant 2h30. Leur glycémie a été mesurée juste avant l'anesthésie puis à 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 et 130 minutes grâce à une goutte de sang prélevée au bout de la queue (Accu-Chek, Roche, France).

L'évaluation de la méthode de mesure de l'index d'insulinorésistance R avec une anesthésie à l'isoflurane est réalisée avec des rats obèses Zucker *fa/fa* mâles insulinorésistants (n=11, 11 semaines, 448,0 ± 28,4g, Charles River, France). La même procédure que précédemment est appliquée (injection *via* un cathéter jugulaire puis fémoral, acquisitions au temps basal puis après deux semaines de traitement ou non à la rosiglitazone). Les rats sont cette fois anesthésiés par voie gazeuse (isoflurane 1,5% dans un mélange oxygène/air 1:1). Un index R a également été calculé pour un groupe de rats Wistar sains (n=10, 428,8 ± 87,5 g,

Charles River, France) avec ce mode d'anesthésie. Pour ces animaux un seul index R a été calculé, ces animaux n'ont pas suivi un traitement de deux semaines à l'instar des rats Zucker auxquels ils sont comparés.

III. Résultats

1) Validation de la technique de mesure de l'IR de manière non invasive en imagerie SPECT 3D

Les index d'insulinorésistance R sont calculés à partir des coefficients de transfert $k(2,1)$, en condition basale et après l'injection d'insuline, à partir des cinétiques myocardiques et sanguines (Figure 27).

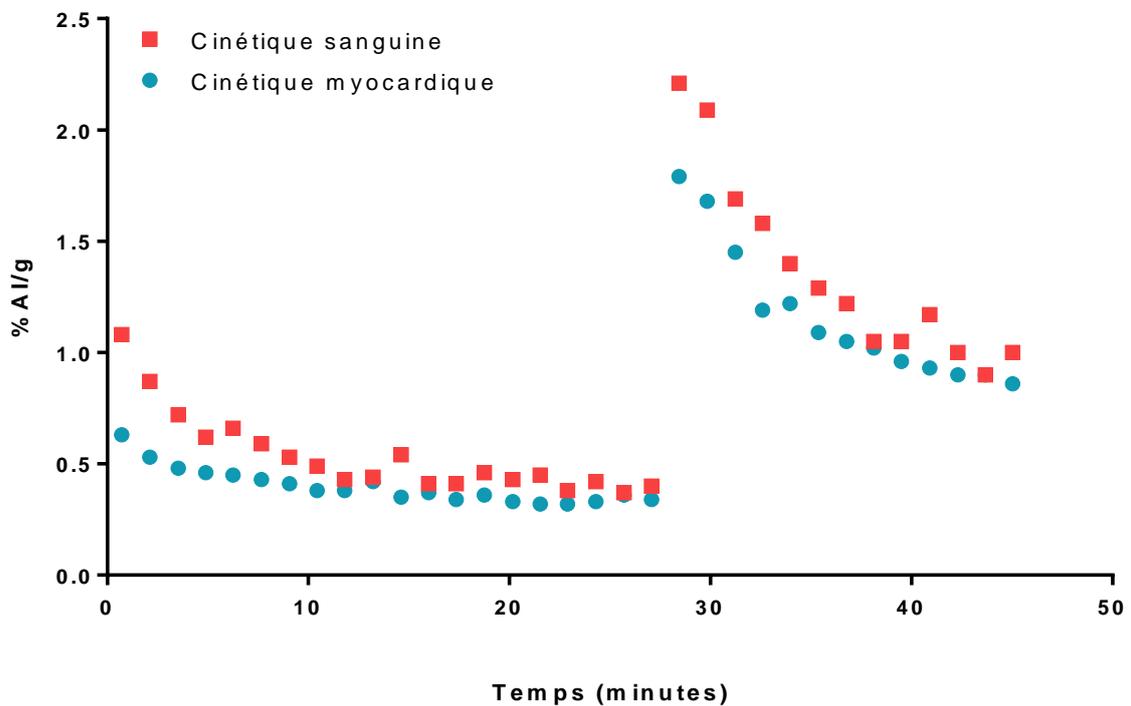


Figure 27 : Cinétiques sanguine et myocardique du 6DIG au cours du protocole d'acquisition. Condition basale de 0 à 20 minutes, puis injection d'insuline et deuxième injection de 6DIG.

Pour chaque animal, 4 index R ont été calculés à partir des cinétiques sanguines obtenues par prélèvements sanguins ou par quantification de la séquence d'images SPECT. L'imagerie permet d'évaluer la cinétique sanguine de 3 façons : dans le ventricule gauche, dans le ventricule droit, ou en sommant les deux (Figure 28).

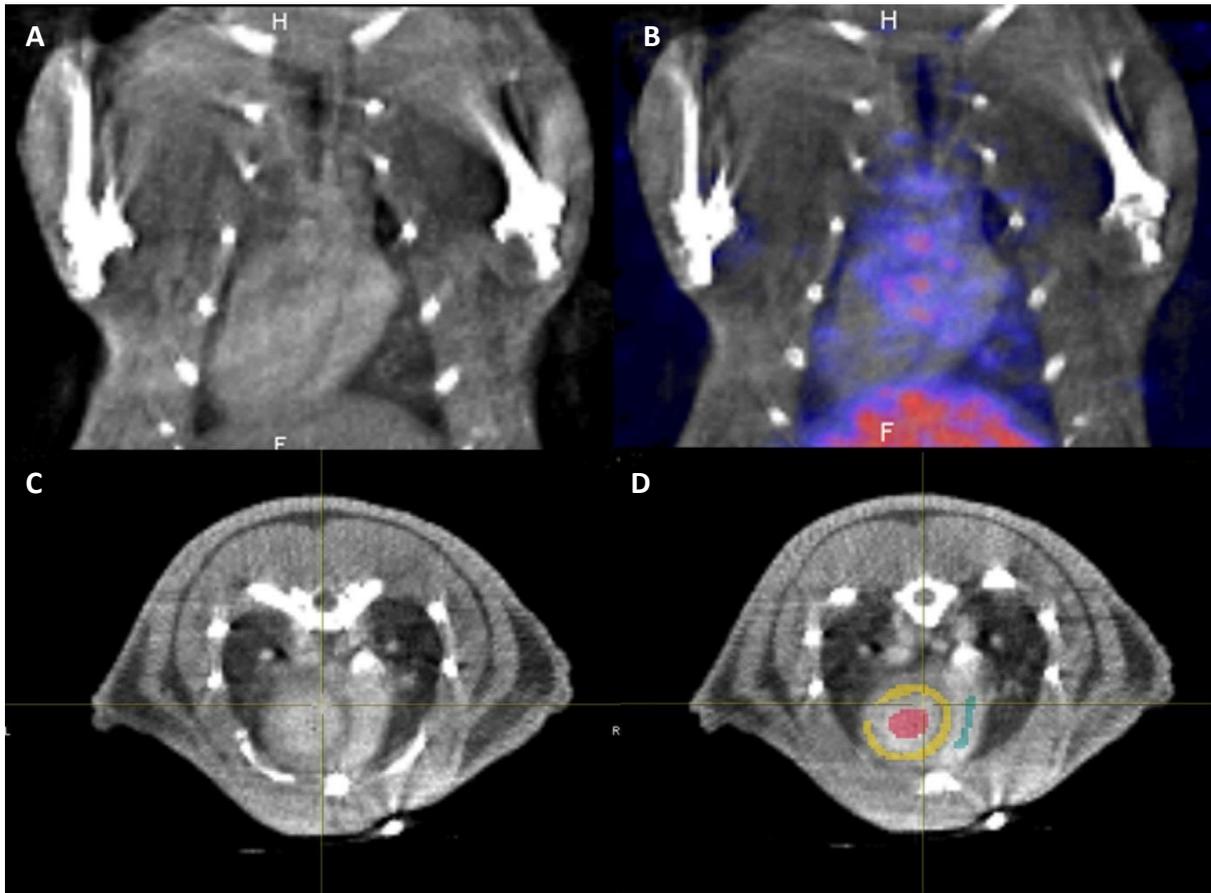


Figure 28 : Exemple d'images obtenues après reconstruction des acquisitions SPECT/CT. A : image CT seule en coupe coronale ; B : Image CT + Image SPECT en coupe coronale ; C : Image CT seule en coupe transversale ; D : Image CT+ VOI tracées dans le myocarde (jaune), le ventricule droit ou VD (bleu) et le ventricule gauche ou VG (rouge).

Dans tous les cas, l'index R est plus faible chez les rats Zucker insulinorésistants que chez les rats Wistar (Figure 29). Cette différence est significative pour les index R calculés avec une activité sanguine provenant des quantifications SPECT du VG, VD et VD+VG ($2,22 \pm 0,36$ vs. $0,93 \pm 0,24$; $2,05 \pm 0,31$ vs. $1,05 \pm 0,34$ et $2,28 \pm 0,53$ vs. $0,95 \pm 0,23$, respectivement, $p < 0,01$). L'index R pour le groupe Zucker, calculé grâce aux cinétiques sanguines obtenues par prélèvements sanguins, n'est pas significativement différent de celui du groupe Wistar ($2,16 \pm 0,80$ vs. $1,24 \pm 0,52$, $p = 0,0952$). Les écart-types sont plus importants dans ce cas-là, toutefois la tendance est la même.

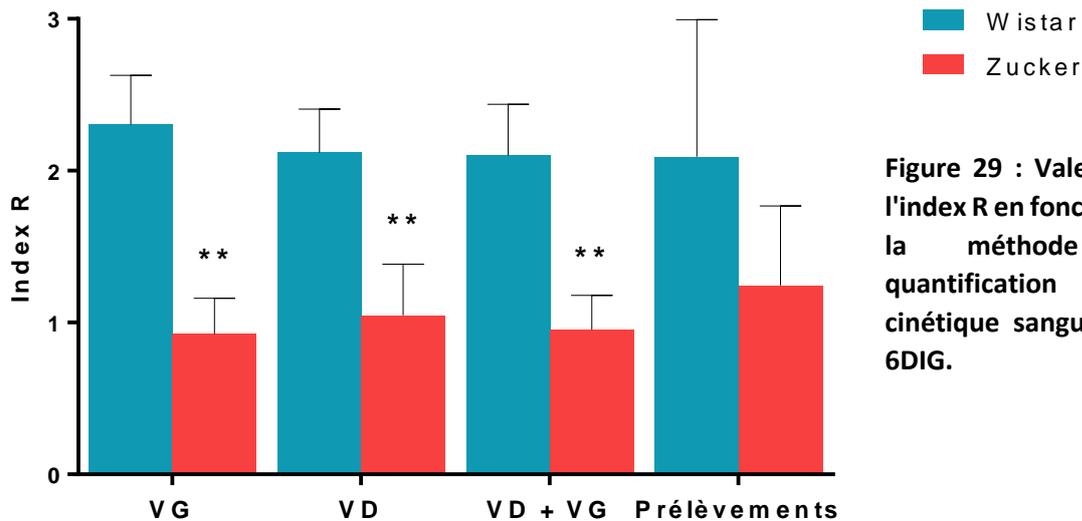


Figure 29 : Valeurs de l'index R en fonction de la méthode de quantification de la cinétique sanguine du 6DIG.

Le calcul de l'index R pour les groupes Wistar et Zucker a été effectué par deux expérimentateurs différents afin de comparer la reproductibilité de la procédure d'analyse des données et de modélisation. L'index R calculé grâce à la cinétique sanguine obtenue par la quantification en imagerie SPECT de l'activité dans le ventricule gauche a par la suite été retenue. Le volume d'intérêt est en effet plus facile à tracer sur ce dernier, plus volumineux que le ventricule droit. Les index obtenus par les deux expérimentateurs sont similaires, comme le montre la corrélation linéaire (Figure 30). Le coefficient de corrélation de concordance confirme ceci avec une valeur de 0,99.

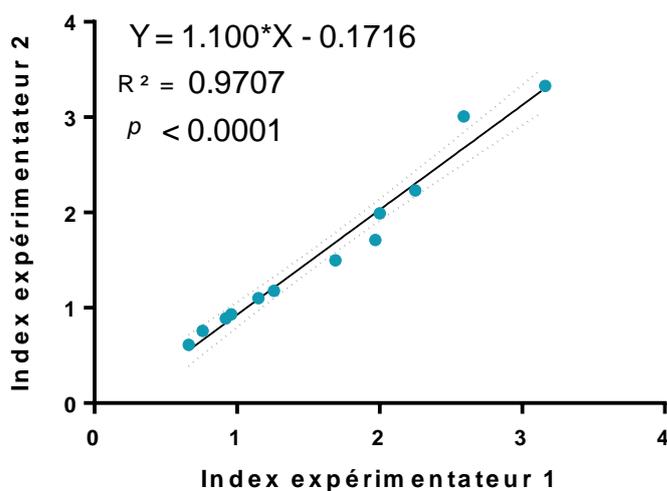


Figure 30 : Corrélation inter-expérimentateurs de l'index d'insulinorésistance R.

2) Sensibilité de la mesure non invasive de l'index R

Les deux groupes de rats Zucker utilisés pour cette étude, préalablement séparés de manière aléatoire, présentent un masse corporelle similaire à J0. À J14 la masse corporelle des deux groupes de rats a augmenté significativement par rapport à J0 ($417,0 \pm 40,1\text{g}$ vs. $376,7 \pm 26,9\text{g}$, $p = 0,03$, et 451 ± 40 vs. $382 \pm 29\text{g}$, $p = 0,01$, pour le groupe placebo et rosiglitazone respectivement). A J14 les masses corporelles des deux groupes ne sont pas significativement différentes (Tableau 3).

Poids des rats (g)	J0	J14
Placebo	$376,7 \pm 26,9$	$417,0 \pm 40,1^*$
Rosiglitazone	$382,0 \pm 29,2$	$451,3 \pm 41,9^*$
Glycémie (mg/dL)		
Placebo	$110,9 \pm 20,7$	$107,1 \pm 26,3$
Rosiglitazone	$119,6 \pm 38,9$	$88,2 \pm 23,1^*$
Evolution de la glycémie en réponse à l'insuline (%)		
Placebo	$-44,1 \pm 8,2$	$-36,7 \pm 17,3$
Rosiglitazone	$-39,4 \pm 17,8$	$-50,8 \pm 17,1$

Tableau 3 : Masse corporelle des rats et données de glycémie avant et après 2 semaines de traitement. n = 6 pour le groupe placebo et n = 8 pour le groupe rosiglitazone, * : $p < 0,05$ pour J14 vs. J0.

La glycémie des deux groupes n'est pas significativement différente, à J0 comme à J14. Elle n'évolue pas de façon significative entre J0 et J14 pour le groupe placebo ($110,9 \pm 20,7$ vs. $107,1 \pm 26,3$ mg/dL) mais diminue de manière significative pour le groupe traité ($119,6 \pm 38,9$ vs. $88,2 \pm 23,1$ mg/dL, $p < 0,05$). La baisse de la glycémie en réponse à l'insuline n'est pas significativement différente entre les deux groupes à J0 et J14. Cette baisse semble s'accroître à J14 pour le groupe rosiglitazone et s'atténuer pour le groupe placebo, toutefois ces différences ne sont pas significatives (Tableau 3).

L'index d'insulinorésistance R est similaire dans les deux groupes avant traitement (Figure 31). Après traitement l'index R est significativement plus élevé pour le groupe traité à la rosiglitazone que pour le groupe placebo ($1,67 \pm 0,70$ vs.

1,05 ± 0,25, $p=0,0332$). Entre J0 et J14 l'index R a tendance à diminuer pour le groupe placebo (1,05 ± 0,25 vs. 1,36 ± 0,32) et à augmenter pour le groupe traité à la rosiglitazone (1,67 ± 0,70 vs. 1,45 ± 0,46). Toutefois ces changements ne sont pas statistiquement validés ($p = 0,219$ et $p = 0,547$ respectivement). Malgré le nombre plus important d'individus dans le groupe traité à la rosiglitazone, l'écart-type reste plus élevé pour ce groupe que pour le groupe placebo. À 14 jours de traitement à la rosiglitazone l'écart-type est élevé (0,70), explicitant une dispersion importante des index R calculés. Les index obtenus pour chaque rat à J0 et J14 sont détaillés figure 31.

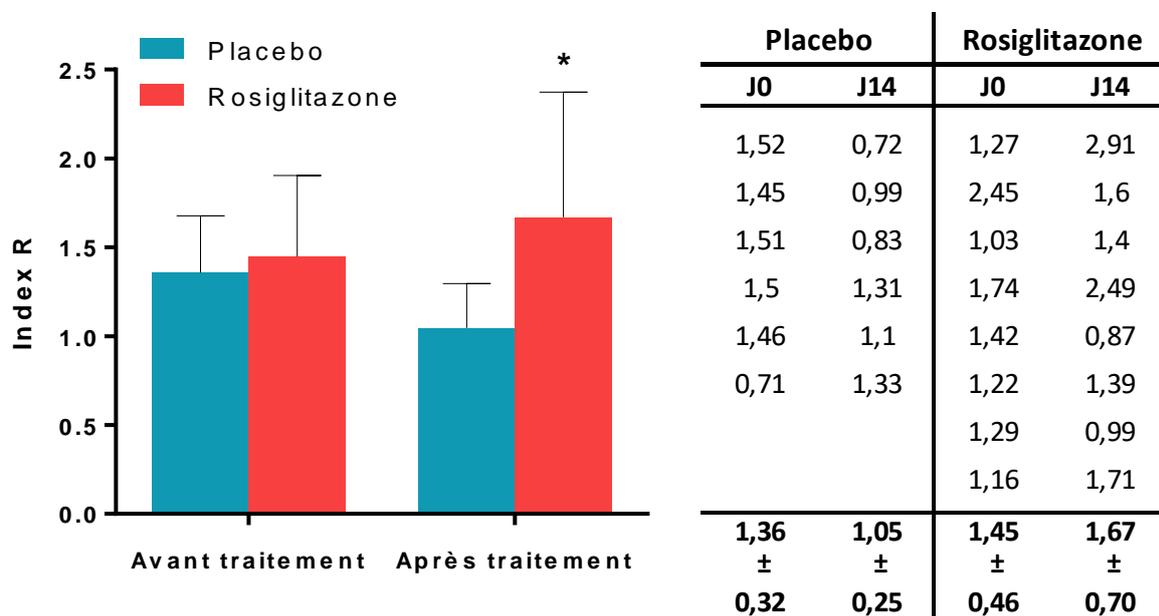


Figure 31 : Effet de la rosiglitazone sur l'évolution de l'index R. n = 6 pour le groupe placebo et n = 8 pour le groupe rosiglitazone. * pour $p < 0,05$ pour vs. placebo.

3) Essai d'optimisation de la méthode

1. Voie d'injection

Les index d'insulinorésistance R sont calculés à partir des coefficients de transfert $k(2,1)$, en condition basale et après l'injection d'insuline, à partir des cinétiques myocardiques et sanguines (activité prise dans le ventricule gauche). L'analyse des données et le calcul de R ont été difficiles pour ces 24 animaux. En

effet la cinétique du traceur après injection en veine caudale semble différente de celle obtenue lors des injections dans la veine fémorale (Figure 32).

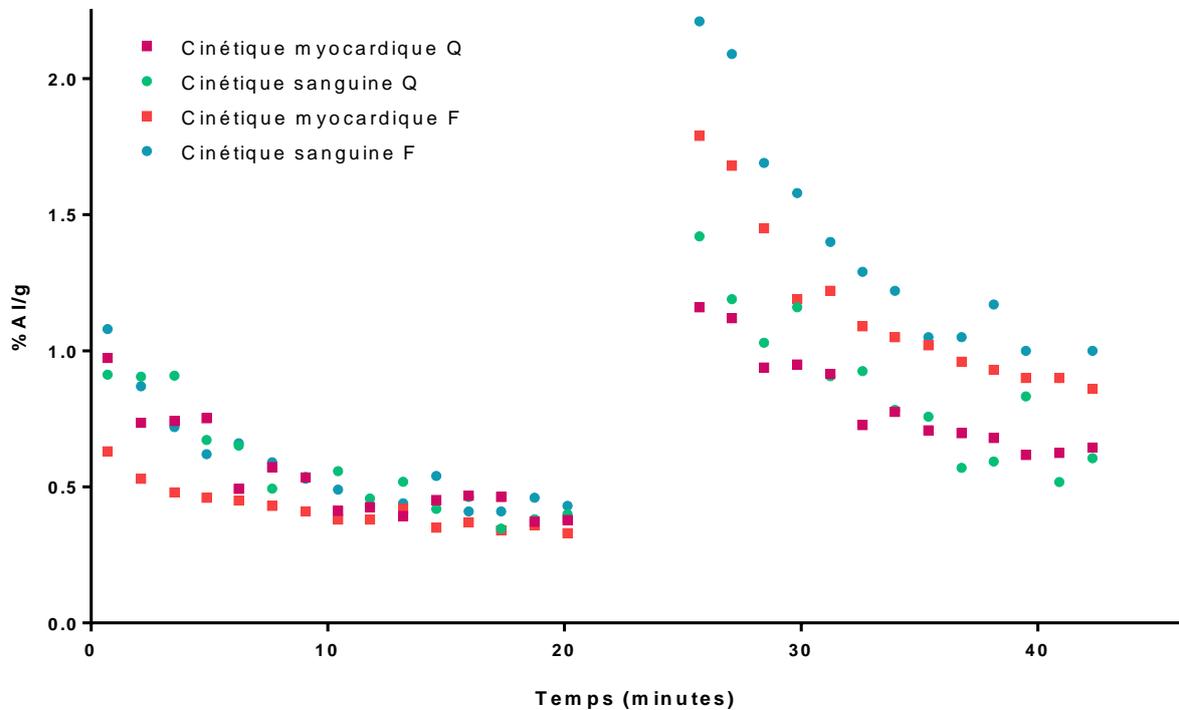


Figure 32 : Comparaison des cinétiques sanguines et myocardiques en fonction du site d'injection du 6DIG. Exemple représentatif issu d'un rat Wistar injecté dans la veine fémorale (cinétiques myocardique et sanguine F), et d'un rat Wistar injecté dans la veine de la queue (cinétiques myocardique et sanguine Q).

Deux différences majeures sont observées : 1) Après la stimulation avec l'insuline ($t = 20$ minutes), le pic d'activité est bien moins important quand l'injection est effectuée dans la veine de la queue par rapport à une injection fémorale. De plus la cinétique sanguine se retrouve superposée avec la cinétique myocardique. 2) La cinétique sanguine est particulièrement "bruitée" lors d'une injection en veine caudale et la radioactivité sanguine est moins élevée que l'activité myocardique pour de nombreux animaux. Ces caractéristiques compliquent la modélisation mathématique dans SAAM, certains points étant très éloignés du *fit* réalisé par le modèle. Il en résulte des valeurs d'index R comprises entre 0,53 et 2,38 pour le groupe de 24 rats Wistar sains injectés en veine caudale. Les index R rats Wistar injectés en veine caudale, comparés à ceux des rats Wistar

(n=6) et Zucker (n=6) injectés en veine fémorale (présentés dans le paragraphe précédent), montrent une disparité très importante (Figure 33).

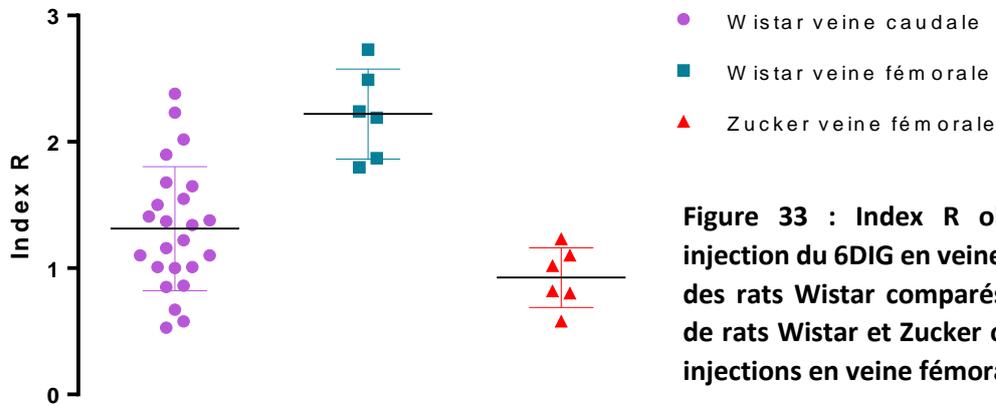


Figure 33 : Index R obtenus après injection du 6DIG en veine caudale chez des rats Wistar comparés aux index R de rats Wistar et Zucker obtenus après injections en veine fémorale.

2. Méthode d'anesthésie

Le suivi de la glycémie après une anesthésie induite et maintenue à l'isoflurane a montré une augmentation de la glycémie pendant les 10 premières minutes suivant l'induction (Figure 34). Les valeurs de glycémie sont plus importantes chez les rats Zucker que chez les rats Wistar. De même l'augmentation est plus importante chez les Zucker.

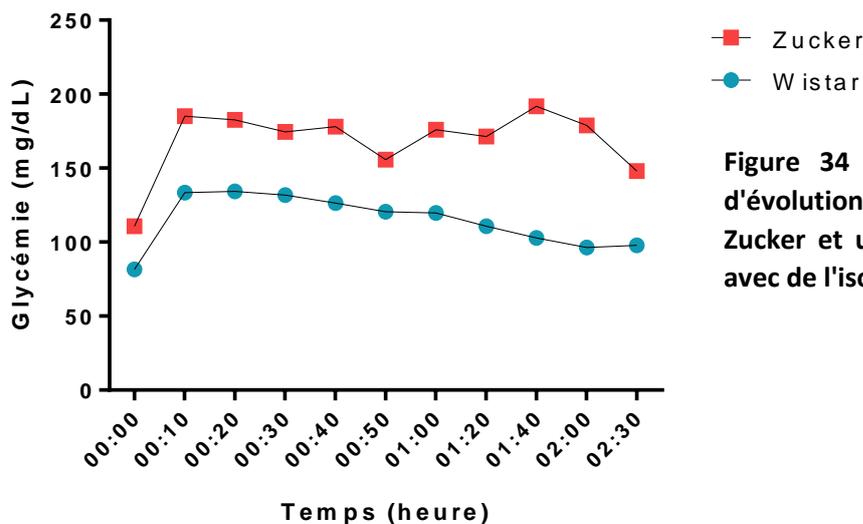


Figure 34 : Exemple représentatif d'évolution de la glycémie chez un rat Zucker et un rat Wistar anesthésiés avec de l'isoflurane.

Malgré l'augmentation de la glycémie, la relative stabilité de cette dernière de 10 à 120 minutes laisse penser qu'il est possible de réaliser l'acquisition SPECT nécessaire au calcul d'un index d'IR, sans être perturbé par des variations de la glycémie.

Des rats Zucker ont ainsi suivi un protocole similaire à celui de la partie 2) ci-dessus, avec deux sessions d'imagerie SPECT, une avant et une après traitement à la rosiglitazone. La glycémie à J0, mesurée sur des animaux anesthésiés à l'isoflurane, est plus élevée que celle observée habituellement sur les animaux anesthésiés au pentobarbital ($207,7 \pm 57,4$ contre $115,9 \pm 31,6$ mg/dL respectivement, $p < 0,0001$). À J14 la glycémie à jeun du groupe rosiglitazone a diminué de manière significative ($142,6 \pm 7,7$ contre $225,6 \pm 59,5$ mg/dL, $p < 0,01$), mais pas celle du groupe placebo. Après 2 semaines de traitement, des pertes sont observées au cours de l'acquisition. Les effectifs en fin d'acquisition sont de $n = 3$ et $n = 6$ pour les groupes placebo et rosiglitazone respectivement. L'effet de l'insuline sur la glycémie est statistiquement plus important après traitement à la rosiglitazone ($-70,8 \pm 4,10$ % contre $-53,4 \pm 25,3$ % de diminution de glycémie), l'effectif du groupe placebo est trop faible pour permettre l'interprétation de la diminution de la glycémie (Tableau 4).

	Glycémie semaine 0 (mg/dL)			Glycémie semaine 2 (dg/mL)		
	Avant insuline	Après insuline	Diminution (%)	Avant insuline	Après insuline	Diminution (%)
Placebo	$189,9 \pm 52,1$	$71,7 \pm 23,8##$	$-62,5 \pm 36,9$	$167,9 \pm 10,4$	$71,7 \pm 6,6$	$-116,1 \pm 22,8$
Rosiglitazone	$225,5 \pm 59,5$	$103,0 \pm 37,6##$	$-53,4 \pm 25,3$	$142,6 \pm 7,7**$	$42,0 \pm 13,2\#$	$-70,8 \pm 4,10*$

Tableau 4 : Glycémie des animaux à t_0 et après 2 semaines de traitement, avant ou après stimulation à l'insuline. $n = 10$ à t_0 pour les deux groupes, en semaine 2 : $n = 10$ et $n = 7$ avant insuline et $n = 3$ et $n = 6$ après insuline, pour groupe placebo et groupe rosiglitazone respectivement ; * vs. t_0 , # vs. basal avant insuline.

Les index R des rats Wistar et des Zucker du groupe rosiglitazone avant traitement, sont répartis sur une grande gamme de valeurs (0,58 à 3,17) (Figure 35). Le groupe des rats Zucker placebo présente des index R regroupés autour de 1. Malgré ces résultats, l'expérimentation a été poussée jusqu'à son terme, avec 2 semaines de traitement. Toutefois, les pertes ont été importantes et les effectifs sont passés de $n=20$ à $n=11$, dont seulement 3 dans le groupe placebo.

Après 2 semaines de traitement la moyenne des index R obtenue est alors de $0,96 \pm 0,20$ pour le groupe placebo (vs. $0,94 \pm 0,21$ au temps initial) et $1,27 \pm 0,32$ pour le groupe rosiglitazone (vs. $1,39 \pm 0,68$ au temps initial). Ces différences ne sont pas significatives.

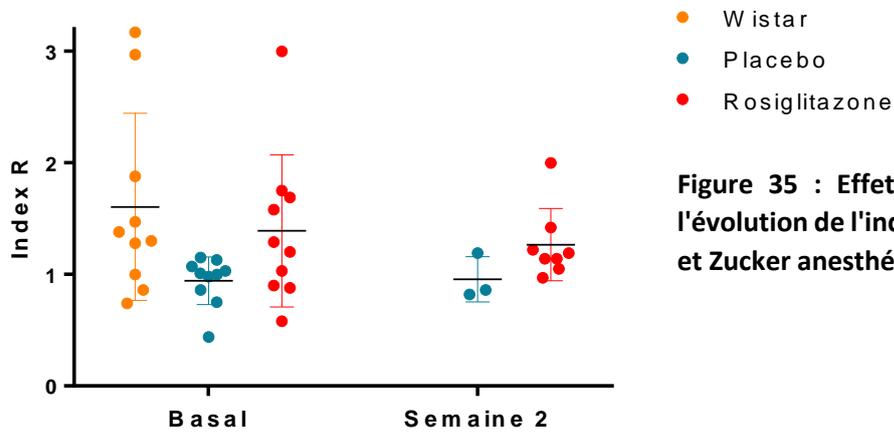


Figure 35 : Effet de la rosiglitazone sur l'évolution de l'index R chez des rats Wistar et Zucker anesthésiés à l'isoflurane.

IV. Discussion

1) Validation de la méthode en imagerie SPECT

Le ^{123}I -6-Déoxy-6-Iodo-D-Glucose, ou 6DIG, un analogue du glucose, est un radiotraceur utilisable en imagerie SPECT. Le 6DIG entre dans les cellules, comme le glucose, par les transporteurs GLUT, mais n'étant pas phosphorylé par l'hexokinase, il en ressort ainsi aussitôt (Koumanov *et al.*, 1996). Cette caractéristique fait de lui un traceur pur du transport du glucose, contrairement au ^{18}F -Fluoro-Déoxy-Glucose (FDG), qui trace les étapes de transport et de phosphorylation du glucose et qui s'accumule dans les cellules.

Des études *in vitro* ont montré que le 6DIG était transporté dans les adipocytes et les cardiomyocytes *via* les transporteurs Glut et que ce transport était stimulé par l'insuline (Henry, Tanti, *et al.*, 1997; Koumanov *et al.*, 1996). Le comportement du 6DIG est ainsi identique à celui du 3OMG (3-O-Methyl-Glucose), le traceur de référence du transport du glucose, qui a montré sa capacité à évaluer la résistance à l'insuline musculaire (Bonadonna *et al.*, 1993). Toutefois ce traceur, utilisable en PET, est marqué soit au carbone 11 (demi-vie 20,4 minutes), soit au carbone 14 (demi-vie 5730 ans). Ces périodes radioactives posent ainsi un problème pratique, dans un cas imposant la proximité du lieu de production et du lieu d'examen, et dans le deuxième cas un problème d'utilisation clinique. L'utilisation de l'iode, dans le cas du 6DIG, et particulièrement de l'iode 123, d'une période de 13,2 h, permet l'utilisation du traceur en imagerie SPECT chez l'homme pour des études *in vivo*.

Des études précliniques ont montré une augmentation significative du transport du traceur dans les tissus insulino-sensibles en présence d'insuline chez des souris contrôles mais pas chez des souris diabétiques (Perret *et al.*, 2003). Une autre étude a montré que le cœur était l'organe qui permettait de discriminer le plus efficacement des rats insulino-résistants de rats sains (Perret *et al.*, 2007). L'évaluation de la résistance cardiaque à l'insuline est possible grâce à un modèle mathématique, nécessitant les cinétiques de captation sanguine et cardiaque du traceur (Slimani *et al.*, 2002). Un index d'insulino-résistance R peut alors être

calculé. Chez le petit animal l'obtention des cinétiques de captation du traceur nécessite un scan thoracique continu, en 2 dimensions, et des prélèvements sanguins réguliers afin d'obtenir une cinétique sanguine. Cette méthodologie permet le calcul d'un index R permettant de discriminer un groupe de rats insulino-résistants d'un groupe sain. De plus cette méthode est suffisamment sensible pour montrer des variations de l'insulino-résistance au cours du temps (Vollaire, 2010). Toutefois cette méthodologie est optimisable sur différents points abordés dans ce travail de thèse.

Dans la première partie de cette étude, le transfert de la technique d'une imagerie 2D à une imagerie 3D, couplée à une imagerie scanner à rayons X a été évalué. L'apport principal de ce changement de modalité doit permettre 1) la quantification précise de la captation du 6DIG dans le compartiment myocardique grâce à l'apport de l'image anatomique CT superposée à l'image SPECT, et 2) l'identification d'un compartiment sanguin permettant d'obtenir une cinétique sanguine du 6DIG sans recourir aux prélèvements.

Afin d'analyser les performances de l'imagerie 3D, les index R d'un groupe de rats Wistar sains et d'un groupe de rats Zucker insulino-résistants ont été comparés. La cinétique sanguine a été obtenue en quantifiant l'activité sanguine de plusieurs manières : par prélèvements sanguins ou par quantification des images SPECT en traçant des zones d'intérêts dans le ventricule gauche et le ventricule droit, ou encore en utilisant la somme des deux VOI précédentes. Dans tous les cas, les index R obtenus pour les différentes méthodes de calcul permettent de discriminer le groupe de rats sains des rats insulino-résistants. Toutefois, si les index obtenus grâce à la quantification de l'activité sanguine en imagerie sont significativement différents entre les rats Wistar et Zucker, ils ne le sont pas en calculant les index R grâce aux prélèvements sanguins. Cela peut paraître surprenant, la technique ayant été initialement validée grâce aux prélèvements sanguins, toutefois cela met en évidence les problèmes liés à cette technique. En effet, il est difficile d'obtenir de manière reproductible et fiable des prélèvements de sang pour tous les animaux. Or ces prélèvements doivent être réalisés à intervalles réguliers et surtout rapprochés (toutes les 30 secondes les 4 premières

minutes après l'injection) afin d'obtenir une cinétique sanguine satisfaisante. Ainsi la qualité de prélèvement de sang peut être altérée, soit par la présence de solution saline héparinée restant dans le cathéter, soit par des phénomènes de coagulation. Ces difficultés techniques, manipulateur-dépendantes, ont pu causer des imprécisions dans les valeurs de cinétique sanguine et peuvent expliquer l'écart type plus important sur le R moyen, calculé grâce aux prélèvements.

Les résultats obtenus à partir des images 3D montrent que le calcul d'un index d'insulinorésistance en imagerie SPECT avec le 6DIG est possible et permet de discriminer un groupe d'animaux sains d'un groupe d'animaux résistants à l'insuline. De plus, la méthode semble suffisamment robuste pour être reproductible au sein d'un groupe d'animaux de même sensibilité à l'insuline.

Les études suivantes peuvent donc être réalisées en calculant l'index R grâce aux quantifications des cinétiques sanguines et myocardiques par imagerie SPECT.

2) Sensibilité de la méthode

L'objectif de ces travaux était de mettre au point une méthode d'évaluation de la résistance à l'insuline pour un suivi longitudinal, notamment dans le cadre de l'évaluation de nouveaux traitements. Ainsi il était indispensable d'évaluer la capacité de la méthode à détecter des variations de la sensibilité à l'insuline au cours du temps. Pour cela la mesure de l'index R de résistance à l'insuline a été répétée deux fois, une fois avant un traitement améliorant la sensibilité à l'insuline, une fois deux semaines après le début de celui-ci. Comme précédemment, le modèle animal de résistance à l'insuline choisi est le rat obèse Zucker, qui présente une insulinorésistance à l'âge de 10 semaines (Jacob *et al.*, 1992). L'agent thérapeutique choisi, la rosiglitazone, est un antidiabétique qui a fait ses preuves dans la sensibilisation à l'insuline (Lautamäki *et al.*, 2005; Lebovitz *et al.*, 2001), mais qui a toutefois été retiré du marché à cause de risques cardiovasculaires importants chez l'homme (Graham *et al.*, 2010; Home *et al.*, 2009; Nissen and Wolski, 2010). En 14 jours de traitement, la rosiglitazone n'a pas eu d'effet significatif ni sur la prise de poids des animaux, ni sur leur glycémie.

Ainsi ces deux paramètres ne permettent pas de différencier le groupe traité du groupe placebo. Toutefois l'index d'insulinorésistance R a permis de mettre en avant une différence entre ces deux groupes. En effet, après 14 jours de traitement, l'index R du groupe traité à la rosiglitazone apparaît significativement plus élevé que celui du groupe placebo. En 14 jours, l'index R moyen a eu tendance à diminuer pour le groupe placebo et à augmenter pour le groupe traité. Une diminution de l'index des rats du groupe placebo pourrait s'expliquer par une dégradation spontanée de la sensibilité à l'insuline des rats Zucker avec l'âge et la prise de poids des animaux. Cette diminution de l'index R n'est toutefois pas suffisante pour être validée statistiquement. De même, l'augmentation de l'index, imputée à un effet potentiel de la rosiglitazone, n'est pas significative, la variabilité entre les individus du groupe traité à la rosiglitazone étant importante. En effet, les index R calculés après traitement sont très variables, allant de 0,87 pour le plus bas à 2,91 pour le plus haut. Il est difficile de savoir si ces variations sont réellement dues à des variations de réponse des animaux au traitement. Toutefois les paramètres comme la glycémie à jeun ou l'évolution de la glycémie en réponse à l'insuline ne présentent pas des variations plus élevées dans le groupe traité que dans le groupe placebo. Par contre lors de la phase de modélisation des courbes sous SAAM II, le *fit* de certaines cinétiques des animaux traités avec la rosiglitazone se sont avérées plus difficiles à obtenir de manière précise. Les coefficients de variation étant moins bons, la précision de calcul de l'index R est également moins bonne pouvant également expliquer ces valeurs d'index "extrêmes".

Ces résultats ont permis de montrer la faisabilité de cette méthode pour la discrimination de groupes de niveau d'insulinorésistance différents. Toutefois, ils ont également mis en évidence un manque de précision pour l'évaluation des variations d'insulinorésistance au cours du temps. Ce manque de précision pourrait provenir du modèle animal, présentant des niveaux de résistance à l'insuline insuffisants pour permettre d'en mesurer une variation en réponse à un traitement. Des études complémentaires impliquant un modèle de résistance à l'insuline plus sévère, comme des rats diabétiques ZDF (Etgen and Oldham, 2000; Shoghi *et al.*, 2008), un traitement plus long pourraient être envisagées afin

d'atténuer la variabilité entre les individus. D'un autre côté, la méthodologie de traitement des cinétiques sanguines et myocardiques grâce au logiciel SAAM II a clairement montré ces limites dans ces capacités à obtenir des *fit* fiables en cas de cinétiques "bruitées". Or si dans les études précédentes, en imagerie planaire, avec une tête de détection fixe, la quantité de coups reçus par l'appareil était suffisamment importante pour obtenir une mesure fiable de la radioactivité dans un petit intervalle de temps. En imagerie SPECT la rotation des détecteurs, nécessaire à l'obtention des différentes projections permettant la reconstruction d'images en 3 dimensions, impacte sur la statistique de comptage et la fiabilité de la mesure. Ainsi si cette modalité d'imagerie en 3 dimensions a permis de mettre au point une méthodologie de quantification robuste et reproductible entre expérimentateurs de l'activité myocardique et sanguine, l'intervalle des échantillonnages s'est montré imparfait. Avec la caméra NanoSPECT/CT utilisée dans cette étude, le temps minimal d'acquisition permettant d'obtenir une statistique de comptage suffisante à la reconstruction d'une image en 3 dimensions est d'environ 1 minute et 20 secondes. La précision de comptage dans un temps aussi court n'est pas optimale et peut expliquer la mauvaise "qualité" de certaines courbes obtenues. De plus, la cinétique de captation du traceur dans les tissus étant extrêmement rapide, un intervalle de mesure de 1 minute et 20 secondes reste très important et ainsi la perte d'information dans ce laps de temps n'est pas à négliger. La réduction du nombre de points dans la cinétique obtenue rendra plus difficile le travail de SAAM II afin de modéliser les courbes adéquates au calcul de l'index R. L'évaluation de cette méthode avec une caméra de technologie plus récente (mode statique, *list-like*), disponible très prochainement au laboratoire, permettra peut-être de raccourcir les intervalles d'acquisition et d'améliorer la précision du comptage, améliorant ainsi les courbes obtenues et la précision du calcul de l'index R. Par ailleurs, la technique de modélisation compartimentale *via* SAAM II n'est pas optimale et il est vraisemblable que l'adaptation au 6DIG d'approches de modélisations mathématiques plus modernes puisse améliorer le traitement des données. Une étude est d'ailleurs actuellement en cours en collaboration avec le Gipsa Lab, dans le cadre du travail de thèse de Marc Filippi.

L'ensemble de ces optimisations pourraient permettre d'améliorer la précision et la fiabilité de la méthode d'obtention de l'index R d'insulinorésistance avec le 6DIG.

3) Essais d'optimisation

Malgré le passage à la technologie SPECT, permettant d'éviter les prélèvements sanguins contraignants, la méthodologie présente toujours quelques inconvénients techniques.

Tout d'abord, la méthode d'injection nécessite la pose d'un cathéter dans une veine fémorale, ou jugulaire. Précédemment, le besoin de nombreux et fréquents prélèvements sanguins justifiait à lui seul la pose également d'un cathéter artériel. La pose d'un cathéter supplémentaire, réservé aux injections, dans une veine voisine, n'était pas alors une grande contrainte supplémentaire. La possibilité d'obtenir une cinétique sanguine par imagerie a rendu inutile la pose du cathéter artériel, laissant le cathéter veineux comme seule raison à une chirurgie légère sur l'animal, et privant la méthode d'un caractère non invasif important dans le cadre d'études longitudinales. Cette partie de l'étude s'est ainsi intéressée au remplacement du cathéter jugulaire ou fémoral par la pose d'un cathéter à ailettes simple dans une des veines latérales de la queue. Cette procédure s'est avérée, dans un premier temps et sans surprise, beaucoup plus simple à mettre en œuvre que la pose d'un cathéter jugulaire ou fémoral.

Toutefois les résultats obtenus sur des rats Wistar sont très variables. Sur les 24 rats testés avec cette méthode, les index R obtenus s'échelonnent de 0,53 à 2,38. Cette très grande variation de l'index R au sein d'une population de rats consanguins insulinosensibles fait ressortir un problème de reproductibilité et de robustesse de la méthode. D'un point de vue méthodologique la pose du cathéter caudal s'est avérée plus complexe chez certains animaux, la faute à des veines plus petites ou se collapsant rapidement. L'observation des cinétiques sanguines et myocardiques a montré une qualité variable de ces dernières. En effet les cinétiques obtenues peuvent être parfois très bruitées (Figure 36), au contraire de celles obtenues habituellement (Figure 27). De plus, celles obtenues sous insuline sont différentes de celles observées habituellement avec une injection en veine fémorale ou jugulaire.

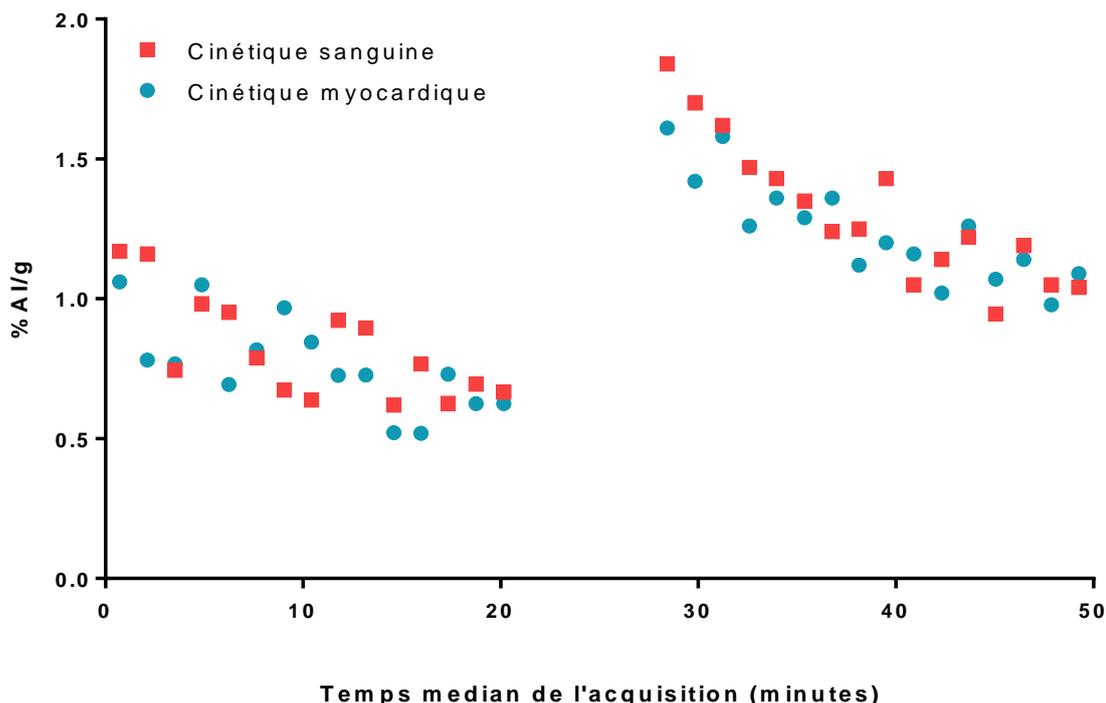


Figure 36 : Exemple représentatif de cinétiques sanguine et myocardiques bruitées obtenues après injection du 6DIG dans la veine caudale de rat Wistar.

En effet, après stimulation par l'insuline, les courbes présentent généralement des pics d'activité importants après l'injection du traceur, avant de redescendre rapidement. De plus, l'activité sanguine est plus importante que l'activité myocardique. Or, avec une injection dans la veine caudale, cette différence est gommée et le pic d'activité maximale est moindre, la pente de la courbe est donc plus faible (Figure 32). Ensemble, ces modifications expliquent des difficultés de modélisation conduisant à des index R peu reproductibles d'un individu à l'autre, et aux valeurs peu cohérentes obtenues. Ces différences peuvent sans doute s'expliquer par une cinétique de distribution du traceur dans l'organisme différente de celle obtenue habituellement avec de plus grosses veines comme la jugulaire ou la fémorale. La veine caudale est plus petite, plus distale, et elle a tendance à se rétracter rapidement en cas de baisse de température, expliquant potentiellement cette différence de distribution. Ainsi les résultats obtenus dans cette partie de l'étude ne permettent pas de valider le changement de site d'injection du traceur

Le second point clé à optimiser pour alléger la procédure concernait l'anesthésique utilisé. En effet, l'utilisation du pentobarbital n'est pas aisée, autant pour l'induction de l'anesthésie que pour son entretien, les difficultés se multipliant encore plus avec des rats obèses comme les rats Zucker. Le tissu adipeux abdominal étant important chez ces animaux

En effet, chez ces animaux, l'induction de l'anesthésie peut facilement se retrouver retardée, en raison d'un tissu adipeux important pouvant retenir l'anesthésique, différant sa distribution dans l'organisme. Ainsi, la question du dosage du pentobarbital et de l'intervalle de répétition des injections pour le maintien de l'anesthésie est problématique. De plus, le réveil des animaux est souvent long et après un certain temps d'anesthésie des complications respiratoires peuvent apparaître, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal. Généralement, pour les examens d'imagerie chez le petit animal, l'anesthésie gazeuse est privilégiée. Des systèmes d'anesthésie sont intégrés aux systèmes d'imagerie et permettent un bon contrôle du sommeil de l'animal. L'anesthésique utilisé habituellement, l'isoflurane, également utilisé en pratique vétérinaire standard, permet une induction de l'anesthésie et un réveil rapide tout en permettant un contrôle facile de son maintien. Différentes publications font référence à l'utilisation de cet anesthésique lors d'études du transport du glucose (Goodpaster *et al.*, 2014; Muzic *et al.*, 2011; Spring-Robinson *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2014). Si dans certaines de ces études la glycémie est ajusté par clamp, toutes ne le sont pas. Ces constatations faites, il paraît alors évident que l'utilisation de l'isoflurane en remplacement du pentobarbital apporterait beaucoup à la simplification de la procédure d'imagerie du 6DIG. Toutefois les anesthésiques volatils sont réputés pour modifier la glycémie au moment de l'induction (Behdad *et al.*, 2014; Kawano *et al.*, 2012; Zuurbier *et al.*, 2008). Des études évoquent des effets inhibiteurs de ces anesthésiques sur la sécrétion de GLP-1 (Glucagon Like Peptide) (Kawano *et al.*, 2012) ou d'insuline (Zuurbier *et al.*, 2008) en réponse à une stimulation au glucose. L'augmentation de la production de glucose hépatique est également évoquée, en lien avec une augmentation plasmatique d'adrénaline, activateur de la glycolyse et de la glycolyse (Horber *et al.*, 1990). Un test effectué au laboratoire a permis de confirmer une partie de ces modifications

métaboliques en mettant en évidence, de manière similaire chez des rats Wistar et des rats Zucker, une augmentation de la glycémie dans les 10 premières minutes de l'anesthésie (Figure 34). Toutefois le niveau de glycémie atteint un plateau à 10 minutes, et reste par la suite relativement stable pendant plus de 2 heures. La demi-heure suivant l'induction de l'anesthésie étant allouée à la pose du cathéter veineux et à l'installation de l'animal dans le lit de la caméra, la brusque modification de glycémie n'a pas lieu pendant l'acquisition SPECT. Le calcul de l'index R se basant sur un ratio des coefficients de transfert, avec ou sans insuline, et pas sur leurs valeurs absolues, il nous a ainsi semblé envisageable de réaliser le protocole de mesure de l'IR malgré l'augmentation de la glycémie. Afin de tester cette hypothèse, le même protocole qu'en partie 2) a été utilisé. Ainsi des rats Zucker, séparés en 2 groupes : un groupe traité à la rosiglitazone pendant 14 jours et un groupe placebo ont été comparés. Ces groupes permettent alors de savoir si le changement du mode d'anesthésie influe sur la détection d'une modulation de l'index R induite par un traitement insulinosensibilisateur.

Les résultats obtenus ont été décevants. Tout d'abord, les rats Zucker répartis aléatoirement en deux groupes (groupe placebo et groupe rosiglitazone), ont montré des valeurs d'index différentes en conditions basales. Le futur groupe receveur du placebo a obtenu des index R satisfaisants, étroitement dispersés autour de 1, et donc cohérents avec leur résistance à l'insuline. Toutefois, le futur groupe receveur du traitement a montré une dispersion plus importante des index R calculés avec des scores allant de 0,53 à 3. Ensuite, et de façon surprenante, l'anesthésie à l'isoflurane a amené une mortalité très importante, réduisant le nombre d'animaux de 20 avant l'imagerie initiale à seulement 11 à l'imagerie finale, laissant le groupe placebo avec un effectif de seulement 3 rats. La grande majorité des décès a eu lieu de manière soudaine et non expliquée en fin de procédure de "cathétérisation" ou en début d'imagerie (session d'imagerie à J14). Le faible nombre d'animaux restant en fin de protocole ne permet pas de comparer l'index des groupes après traitement, la comparaison des index R avant et après traitement à la rosiglitazone n'est pas non plus réellement pertinente au vu de la dispersion des données au temps basal. Suite à cette déconvenue, un groupe de rats standards Wistar a également été soumis à un protocole d'acquisition avec le

6DIG. Les index R d'insulinorésistance calculé pour ce groupe d'animaux sains ont également été très variables ($0,74 < R < 3,17$). Si le plateau atteint par la glycémie après l'induction de l'anesthésie avec l'isoflurane avait pu laisser croire à une certaine stabilité, permettant la réalisation du protocole d'imagerie avec le 6DIG, les modifications causées sur le transport du glucose par l'anesthésique semblent finalement trop importantes pour envisager le calcul d'un index R fiable. Ainsi, il ne semble pas envisageable de remplacer le pentobarbital, réputé pour son faible impact sur le métabolisme, par un anesthésique volatil comme l'isoflurane, plus simple d'utilisation et qui aurait dû s'avérer plus sûr pour les animaux.

4) Conclusion

Cette étude a permis de montrer qu'il était possible d'évaluer la résistance à l'insuline en imagerie SPECT-CT grâce au 6DIG, un traceur du transport du glucose. Le calcul d'un index d'insulinorésistance cardiaque appelé R nécessite les cinétiques sanguines et myocardiques du 6DIG au cours de l'acquisition. Jusqu'alors réalisées en imagerie planaire, l'obtention de la cinétique sanguine du traceur nécessitait la réalisation de prélèvements sanguins successifs, contraignants et incompatibles avec une méthode de suivi longitudinal de l'insulinorésistance. Dans cette étude, le passage d'une acquisition planaire à tridimensionnelle, en imagerie SPECT-CT, a permis de s'affranchir des prélèvements sanguins en permettant l'obtention de la cinétique sanguine en imagerie. Les index R ainsi obtenus en imagerie SPECT-CT ont permis de discriminer un groupe de rats sains d'un groupe de rats insulinorésistants.

Même sans prélèvements sanguins la méthodologie reste lourde à mettre en œuvre. Un des objectifs de cette étude a été l'optimisation de la méthodologie afin de la rendre encore plus compatible avec le suivi longitudinal d'un même individu. Pour cela le remplacement de deux points méthodologiques a été évalué :

- Le remplacement de l'anesthésique injectable par un anesthésique volatil, permettant une meilleure gestion de l'anesthésie et un réveil facilité pour les animaux.
- Le remplacement du cathéter veineux en veine jugulaire ou fémorale, nécessitant une chirurgie légère, par un cathéter posé de manière non invasive en veine caudale.

Dans les deux cas ces changements dans la méthodologie n'ont pas permis l'obtention d'un index d'insulinorésistance fiable.

La sensibilité de la méthode a été évaluée en comparant les index R mesurés avant et après un traitement insulinosensibilisateur. En absence d'optimisation la méthodologie reste lourde et de la mortalité a été observée. De plus une grande variabilité a été observée entre les individus traités et l'amélioration de l'index R n'a pu être validée statistiquement. La méthodologie et la sensibilité de la méthode de mesure nécessite de plus amples études pour permettre au 6DIG d'être utilisable chez le petit animal pour le suivi longitudinal de l'insulinorésistance.

2ème partie : Stéato-hépatopathies et traceur de l'inflammation

I. Introduction bibliographique

Les stéato-hépatopathies non alcooliques (ou NAFLD pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease) constituent la première cause de maladies chroniques du foie (Younossi *et al.*, 2015, 2011). Les NAFLD représentent un large spectre de pathologies de gravités graduelles allant de la simple stéatose hépatique à la fibrose, la cirrhose et même l'hépatocarcinome. Les NAFLD sont étroitement liées à l'obésité et à l'insulinorésistance, dont la prévalence n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies, ainsi elles suivent une évolution similaire. Il est estimé qu'aujourd'hui 25% de la population mondiale seraient touchés par les NAFLD (Younossi *et al.*, 2015). Cependant, il existe un manque d'outils diagnostiques, notamment pour les premiers stades asymptomatiques de la maladie, cette prévalence serait donc sous-estimée.

1) Le foie

Le foie joue un rôle central dans la régulation des métabolismes lipidique et glucidique. Il est le principal lieu de synthèse de glucose et de lipides de l'organisme, et est ainsi un acteur privilégié du contrôle de l'homéostasie glucidique et lipidique. Il a également des fonctions de détoxification et de synthèse de produits comme la bile, favorisant la digestion des lipides. Le foie est constitué principalement de cellules appelées hépatocytes assurant la plupart des fonctions hépatiques. Ce sont des cellules polarisées, organisées en rangées autour de sinusoides, formant ainsi des acini (Figure 37, Servier Medical Art).

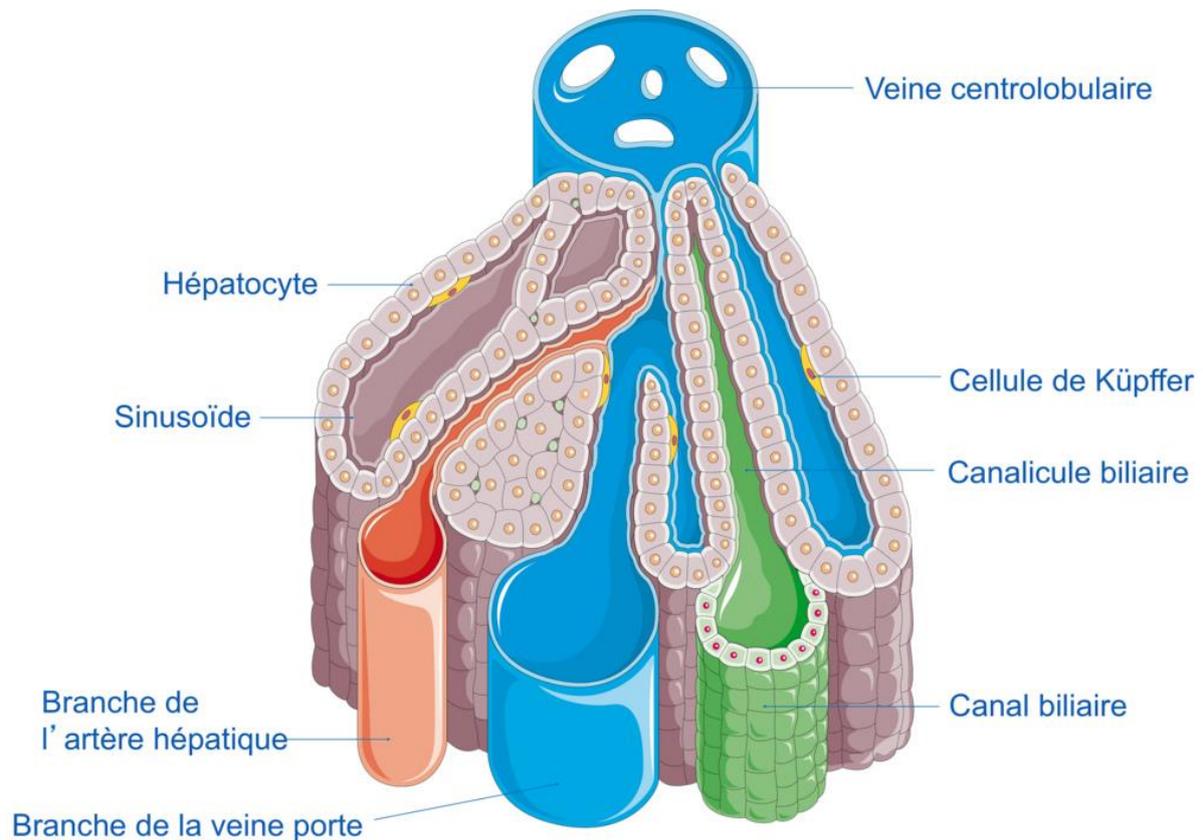


Figure 37 : Organisation cellulaire du tissu hépatique (Servier Medical Art).

Les sinusoides hépatiques sont des capillaires sanguins présentant une structure épithéliale particulière. En effet la barrière épithéliale de ce compartiment présente des *fenestrae*, des espaces entre les cellules épithéliales du sinusoides, ce qui la rend très perméable. Les cellules du système immunitaire inné du foie sont résidentes du sinusoides hépatique. Parmi elles se retrouvent les cellules de Kupffer (Kupffer Cell : KC), une sous espèce de macrophages, spécifique au foie.

Entre les rangés d'hépatocytes et les cellules épithéliales du sinusoides se trouve un espace appelé "espace de Disse". Dans cet espace se trouvent d'autres cellules spécifiques du foie, les cellules stellaires hépatiques (Hepatic Stellate Cell : HSC), ou cellules étoilées. Leur fonction première est d'assurer le stockage de la vitamine A, pour tout l'organisme, sous forme estérifiée dans des gouttelettes lipidiques. L'ensemble de ces structures forme l'unité fonctionnelle du foie, le lobule hépatique. Les lobules sont organisés autour d'une importante irrigation sanguine, *via* la veine porte et l'artère hépatique, grandement subdivisées en

capillaires. L'ensemble de ces lobules forme des lobes de tailles différentes. Chez l'homme ils sont au nombre de 4 : le lobe droit, représentant deux tiers du volume ; le lobe gauche, représentant un tiers du volume, et deux lobes mineurs en taille, le lobe caudé et le lobe carré (Figure 38, CHU du Canton de Vaud, Suisse).

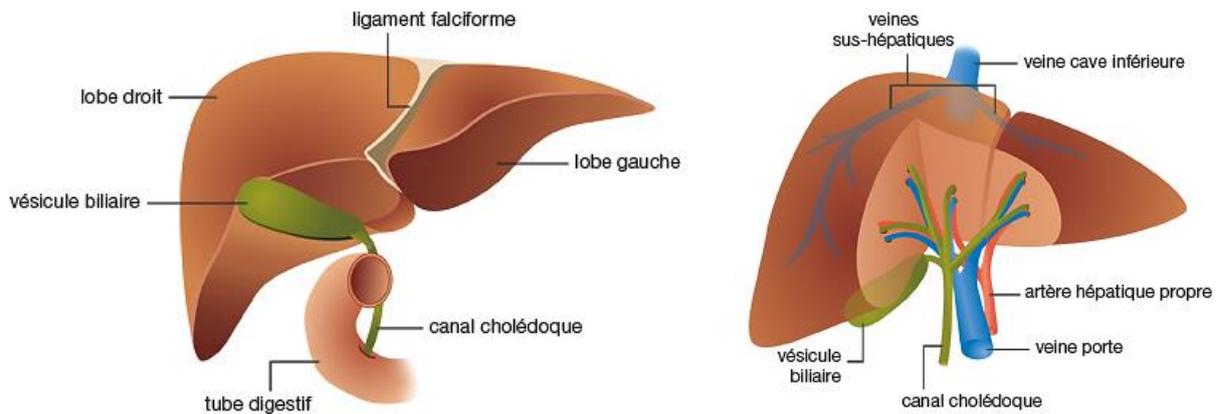


Figure 38 : Anatomie du foie (CHU du Canton de Vaud, Suisse).

2) Les stéato-hépatopathies non alcooliques

Les stéato-hépatopathies non alcooliques (ou NAFLD pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease) constituent la première cause de maladies chroniques du foie (de Alwis and Day, 2008). Si cette pathologie partage des similitudes avec les maladies hépatiques en lien avec la surconsommation d'alcool, elle n'en partage toutefois pas les causes. La stéato-hépatopathie est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique, et est donc en lien étroit avec l'obésité, le diabète et l'insulinorésistance. La prévalence de l'obésité a doublé depuis les années 80. En 2014 environ 2 milliards de personnes étaient en surpoids et plus de 600 millions étaient obèses (Organisation Mondiale de la Santé, aide-mémoire N°311 juin 2016). Ainsi la prévalence des NAFLD a fortement augmenté ces dernières années atteignant environ 25% de la population mondiale (Younossi *et al.*, 2015).

Les NAFLD constituent un spectre de pathologies allant de la stéatose, simple accumulation intracellulaire de lipides, à la NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis), ajoutant à la stéatose un stress oxydant et des phénomènes

inflammatoires chroniques. Si la stéatose simple est sans danger pour le foie, la progression de la NASH s'accompagne de dommages hépatiques progressifs pouvant laisser à terme des dommages permanents, sur un plan à la fois structurel et fonctionnel. Cependant l'état de santé des personnes atteintes de NASH n'est généralement pas impacté avant que la maladie n'atteigne des stades vraiment avancés. Si 25% de la population mondiale semblent être touchés par les NAFLD, entre 2 et 5% seraient atteints de NASH. Une NASH sévère non traitée pourra alors progresser lentement, s'accompagnant de fibrose, et en 10 à 15 ans causer des dommages hépatiques irréversibles menant à la cirrhose ou même à l'hépatocarcinome. Ces stades graves et avancés de NAFLD représentent aux Etats-Unis la 2^{ème} cause de mortalité et la 3^{ème} cause de transplantation du foie (CDC vital statistic report, 2016).

1. La théorie des "hits"

Afin de décrire la progression de la pathologie, de l'apparition de la stéatose aux stades les plus avancés, la théorie des "hits" a été élaborée, suggérant une pathogenèse en deux temps (Jung and Choi, 2014; Yilmaz, 2012). Le premier "hit" est toujours lié à l'accumulation de triglycérides (TG) en gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes : c'est la stéatose. Si la stéatose est considérée comme bénigne et asymptomatique, elle est toutefois toujours le point de départ de la maladie. Elle est généralement causée par des perturbations des différents flux lipidiques qui vont globalement tendre vers une accumulation de lipides dans le foie (Basaranoglu and Ormeci, 2014) (Figure 39).

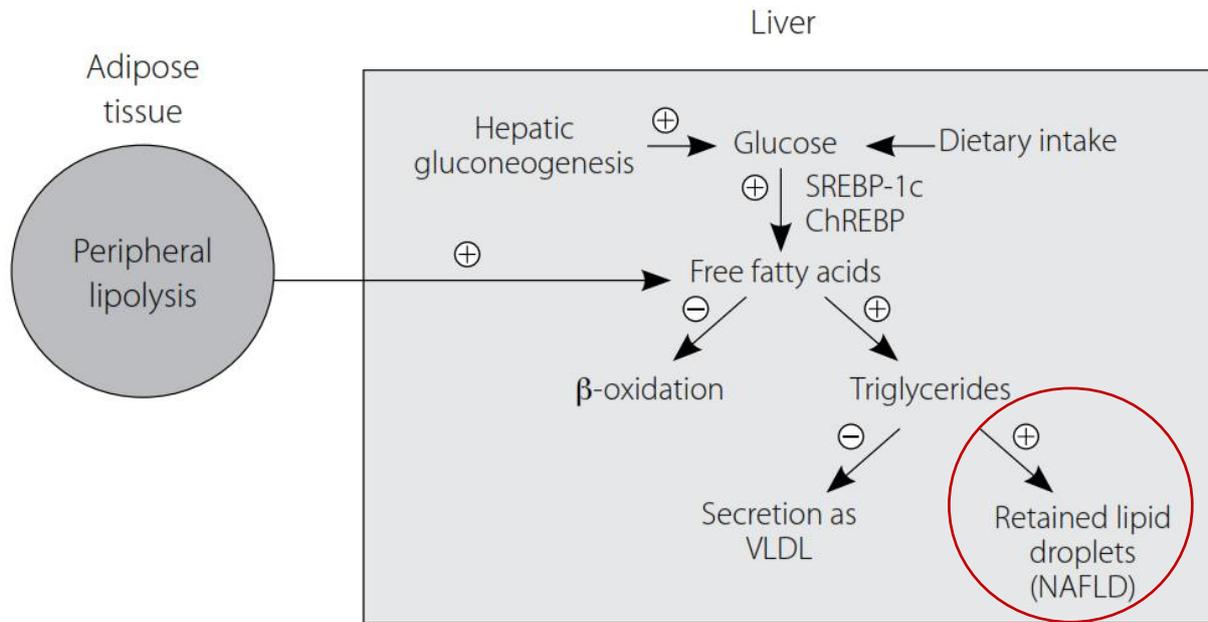


Figure 39 : Des perturbations des flux métaboliques conduisent à la stéatose hépatique (Basaranoglu and Ormeci, 2014). L'augmentation de l'apport exogène de glucose, l'augmentation de la néoglucogénèse hépatique et l'augmentation de la lipolyse périphérique causent l'accumulation progressive d'acides gras dans le foie. Associée à une diminution de leur métabolisation par la β -oxydation et de leur export *via* les VLDL, les acides gras vont être stockés dans le foie sous forme de gouttellettes lipidiques.

Le foie reçoit des acides gras provenant de différentes sources : nutrition, tissus adipeux et synthèse *de novo* à partir du glucose. Ces acides gras peuvent alors soit être métabolisés dans la mitochondrie par la voie de la β oxydation, soit être estérifiés et stockés dans le foie sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques. Mais ils peuvent également être pris en charge par les VLDL afin d'être exportés dans la circulation sanguine (Figure 40) (Cohen *et al.*, 2011).

Les perturbations métaboliques à l'origine du développement des NAFLD et de l'apparition de la stéatose hépatique sont étroitement liées au syndrome métabolique. Ainsi la suralimentation et la sédentarité causent l'augmentation des apports lipidiques et glucidiques exogènes, et l'augmentation du tissu adipeux engendrera plus de lipolyse périphérique. Dans un même temps la résistance à l'insuline et la lipotoxicité naissante, impactent négativement la β -oxydation, et la sécrétion de VLDL est diminuée. L'ensemble de ces modifications des flux métaboliques vont causer l'apparition de la stéatose hépatique.

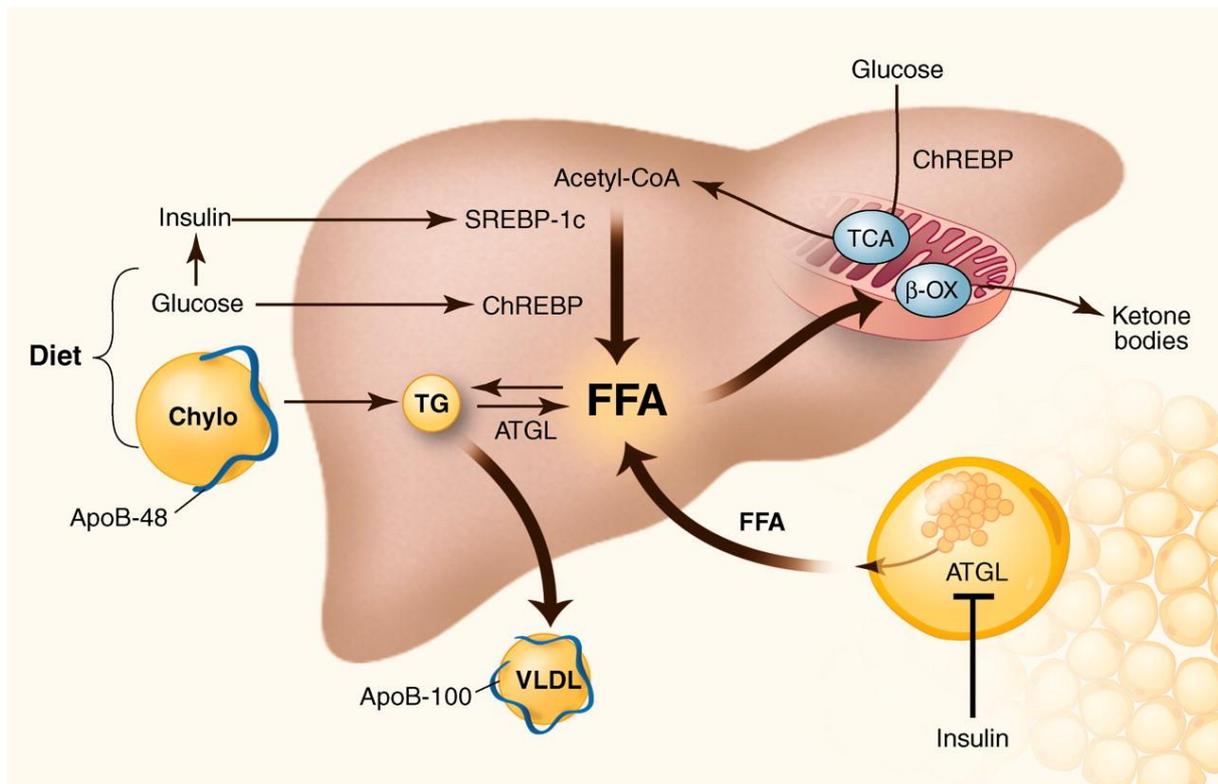


Figure 40 : Gestion des flux de lipides dans le foie sain (Cohen *et al.*, 2011). Les acides gras présents dans le foie proviennent à la fois d'un apport alimentaire *via* les chylomicrons (Chylo) et des acides gras circulants issus de la lipolyse du tissu adipeux périphérique (FFA). La quantité de lipides hépatiques est régulée *via* leur métabolisme dans la mitochondrie et *via* leur export sous forme de VLDL pour un stockage vers le tissu adipeux périphérique.

Le second "hit" représente les perturbations qui vont faire progresser la pathologie de la simple stéatose bénigne à la NASH. Le point de départ de ce second "hit" va être principalement la lipotoxicité créée par les lipides accumulés dans le foie. Ces lipides vont déclencher de nombreuses voies de signalisation pro inflammatoires, fibrotiques et apoptotiques caractérisant le stade de la NASH (Figure 41) (Xu *et al.*, 2015).

Il est toutefois possible de différencier les effets de ces lipides selon leur nature. L'accumulation de triglycérides, plutôt inertes, est plutôt bénigne et cause simplement la stéatose. Les acides gras libres et leurs métabolites seraient quant à eux responsables des dommages hépatiques et de la progression de NAFLD à NASH (Li *et al.*, 2009). En effet, ces derniers semblent être les responsables d'un stress du réticulum endoplasmique et de la production d'espèces

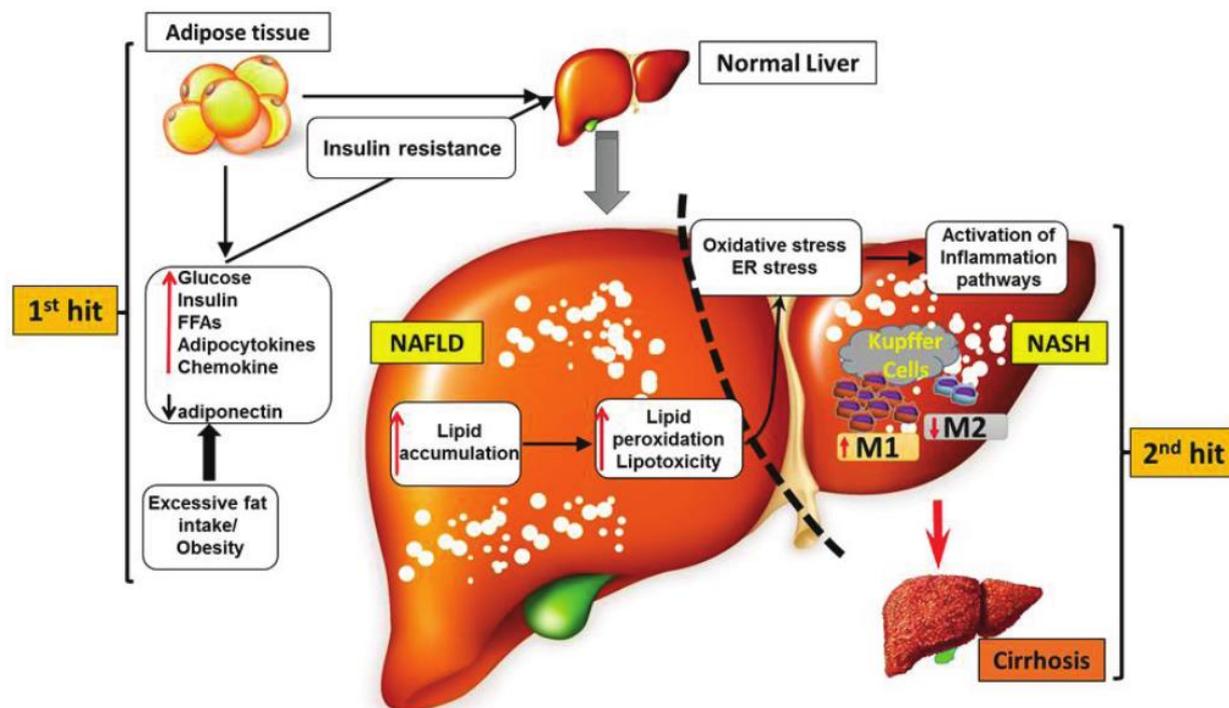


Figure 41 : Développement de la NASH en 2 "hits" (Xu et al., 2015). Le premier "hit" regroupe un apport excessif en lipides et un métabolisme lipidique dérégulé causant l'accumulation de lipides dans les cellules hépatiques. Le second "hit" regroupe les stress et réactions inflammatoires, avec notamment une activation des macrophages hépatiques de type M1, mises en place en réponse à une stéatose prononcée, causant, à terme, des dommages hépatiques irréversibles.

réactives de l'oxygène qui ensemble sont responsables des phénomènes inflammatoires et apoptotiques (Alkhoury *et al.*, 2009; Auguet *et al.*, 2014).

2. Mitochondrie et stress oxydant

La voie intrinsèque de l'apoptose est dépendante de la mitochondrie, lieu de métabolisation des acides gras *via* la β -oxydation. Cette oxydation des lipides nécessite au sein de la mitochondrie la sollicitation de la chaîne respiratoire. Elle permet le transport d'électrons dans la membrane interne de la mitochondrie et l'échange de protons à travers celle-ci. Ces échanges vont permettre le fonctionnement de l'ATP synthase et donc la production d'ATP. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire est régulé et aboutit à la prise en charge de ces derniers par le cytochrome c oxydase, ou complexe IV, qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Toutefois, de rares électrons peuvent s'échapper de la chaîne respiratoire et réagir directement avec de l'oxygène pour former des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species). En

conditions physiologiques ces derniers sont plutôt bien pris en charge et neutralisés par la cellule au fur et à mesure de leur production. Toutefois l'accumulation d'acides gras dans la cellule cause une perméabilisation de la membrane des mitochondries perturbant le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire. La quantité d'électrons "échappant" à la chaîne respiratoire augmente alors et provoque une hausse de la production des ROS (Feldstein *et al.*, 2004; Malhi *et al.*, 2006). Ces ROS en quantité anormale pourront alors causer des dommages oxydatifs dans la cellule, notamment sur l'ADN, entraînant entre autres l'activation de la protéine *p53*. Cette protéine, facteur de transcription gérant la mort programmée de la cellule est alors responsable de la formation de pores de transition de perméabilité dans la membrane des mitochondries. Les ROS sont également capables de réagir directement avec la membrane des mitochondries et de l'endommager. Dans tous les cas cela conduit à l'ouverture de la mitochondrie, répandant ainsi dans le cytosol des molécules pro apoptotiques, dont le cytochrome c ou encore l'AIF (Apoptosis Inducing Factor). Ces derniers participeront alors à la formation d'apoptosomes, producteurs de caspase 9, principale protéase effectrice de la mort cellulaire.

3. *Stress du réticulum endoplasmic*

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite important au sein de la cellule pour la synthèse et le repliement des protéines mais aussi pour leur transfert vers l'appareil de Golgi, indispensable à leur export extracellulaire. Le repliement des protéines est une étape importante de leur maturation, la conformation spatiale étant liée à leur fonctionnalité. Des perturbations de l'homéostasie glucidique, lipidique ou encore calcique, mais aussi des affections virales, peuvent être la cause d'une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Cela va causer un stress du RE déclenchant ainsi un mécanisme de protection, l'UPR (Unfolded Protein Response). L'UPR va alors intervenir pour tenter de rétablir l'homéostasie protéique en bloquant la synthèse protéique *via* l'arrêt de la traduction. De plus, la dégradation lysosomale des protéines mal repliées est stimulée et les protéines chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines sont surexprimées. Dans la plupart des cas, si la nécessité

d'adaptation est transitoire, l'UPR permettra de rétablir l'homéostasie protéique. Toutefois, si ce stress perdure, de nouvelles voies de signalisation vont être activées, pro-inflammatoires *via* l'activation de NF- κ B, et pro-apoptotiques *via* celle de JNK et la voie intrinsèque (Xu, 2005).

Il a été montré que l'UPR pouvait être déclenché directement par les acides gras libres en interagissant directement avec ce mécanisme (Boden *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006). Une infusion de glucose et de lipides en quantités physiologiques chez des rats à jeun peut même moduler l'activité des facteurs de transcription des senseurs du stress du RE (Boden *et al.*, 2011). Ainsi une activation persistante de l'UPR se retrouve chez les patients atteints de NAFLD. De plus, une déficience dans la signalisation des effecteurs censés rétablir

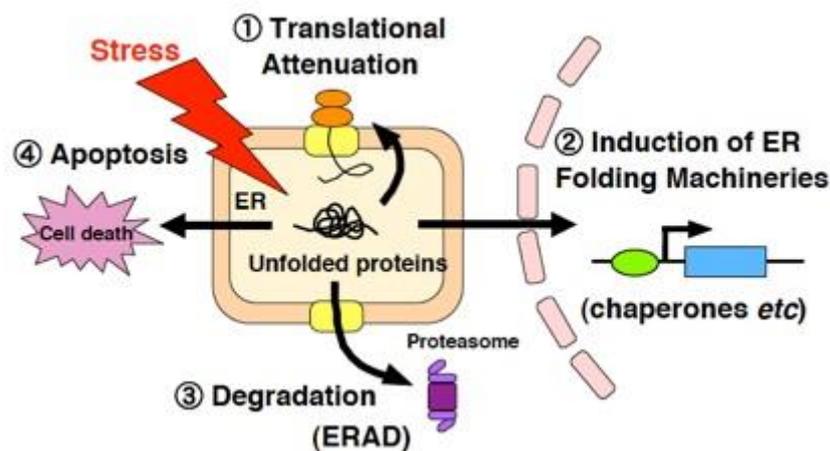


Figure 42 : Système de dégradation ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation) (d'après Institute for Genome Research, The University of Tokushima, site internet). Le système ERAD cible les protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique pour entraîner leur ubiquitination et leur dégradation dans le protéasome.

l'homéostasie protéique a été mise en évidence (Puri *et al.*, 2008). Des protéines comme XBP1 (X-box binding protein 1) ou encore des gènes comme GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein) font partie de ces effecteurs. Ils sont impliqués à plusieurs niveaux dans la dégradation des protéines piégées dans le RE *via* le système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation), censé dégrader les protéines mal repliées (Figure 42, université de Tokushima Institute for Genome Research). Face à la défaillance de la signalisation adaptative et de ces effecteurs, et le stress étant persistant chez les

patients atteints de NAFLD, l'UPR va alors se diriger vers une signalisation pro-apoptotique *via* la voie intrinsèque.

4. Apoptose

Les deux voies d'exécution de l'apoptose semblent être impliquées dans la progression des NAFLD vers la NASH. Des études ont montré que les acides gras libres promouvaient l'apoptose au sein du tissu hépatique. De plus, les acides gras saturés seraient les plus néfastes (Li *et al.*, 2009). En effet, en plus d'interagir directement avec les TLR4 (Toll-Like Receptor 4), promoteurs d'inflammation, les acides gras sont capables d'interagir avec les récepteurs de mort impliqués dans le

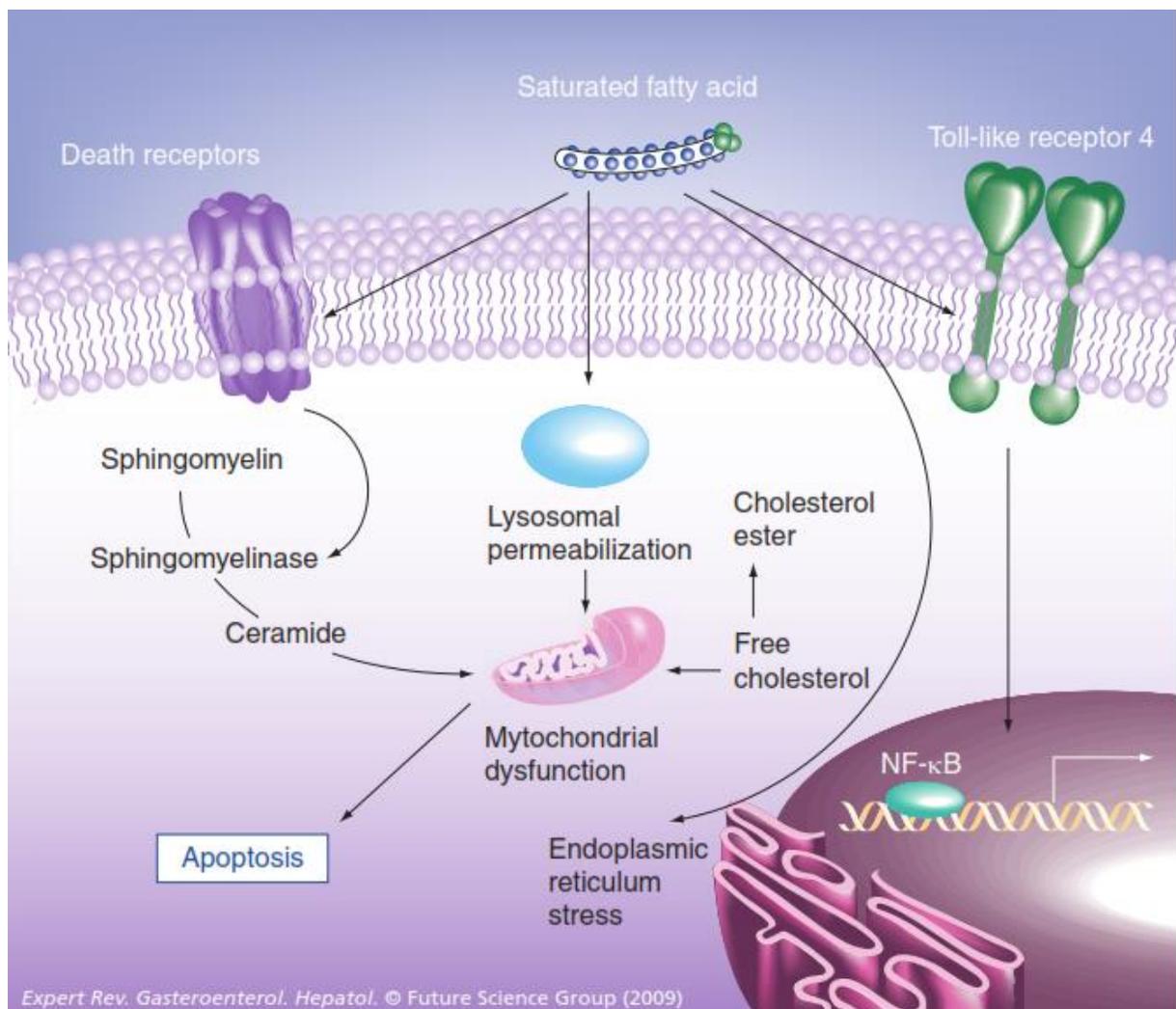


Figure 43 : Les acides gras saturés déclenchent l'apoptose des hépatocytes (Alkhoury *et al.*, 2009). Ces acides gras interagissent avec les récepteurs de mort et augmentent la perméabilisation des lysosomes et le stress du reticulum, induisant ainsi des dysfonctions mitochondriales qui vont aboutir à l'apoptose. Les acides gras saturés agissent également sur les TLR4 pour déclencher des réactions inflammatoires.

processus apoptotique conduisant au stress mitochondrial puis à la mort cellulaire (voie intrinsèque). La voie extrinsèque est quant à elle stimulée notamment par la surexpression des récepteurs de mort Fas, TNF et TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) au cours du développement de la NASH (Feldstein, Canbay, Angulo, *et al.*, 2003; Feldstein, Canbay, Guicciardi, *et al.*, 2003; Malhi *et al.*, 2007). La sensibilité des hépatocytes à tous les signaux de mort cellulaire externe est alors grandement augmentée (Figure 43) (Alkhoury *et al.*, 2009).

5. Processus inflammatoires

La pathogenèse de la NASH expliquée par la théorie des "hits" définit l'inflammation comme le pivot central entre la stéatose bénigne et la NASH. La

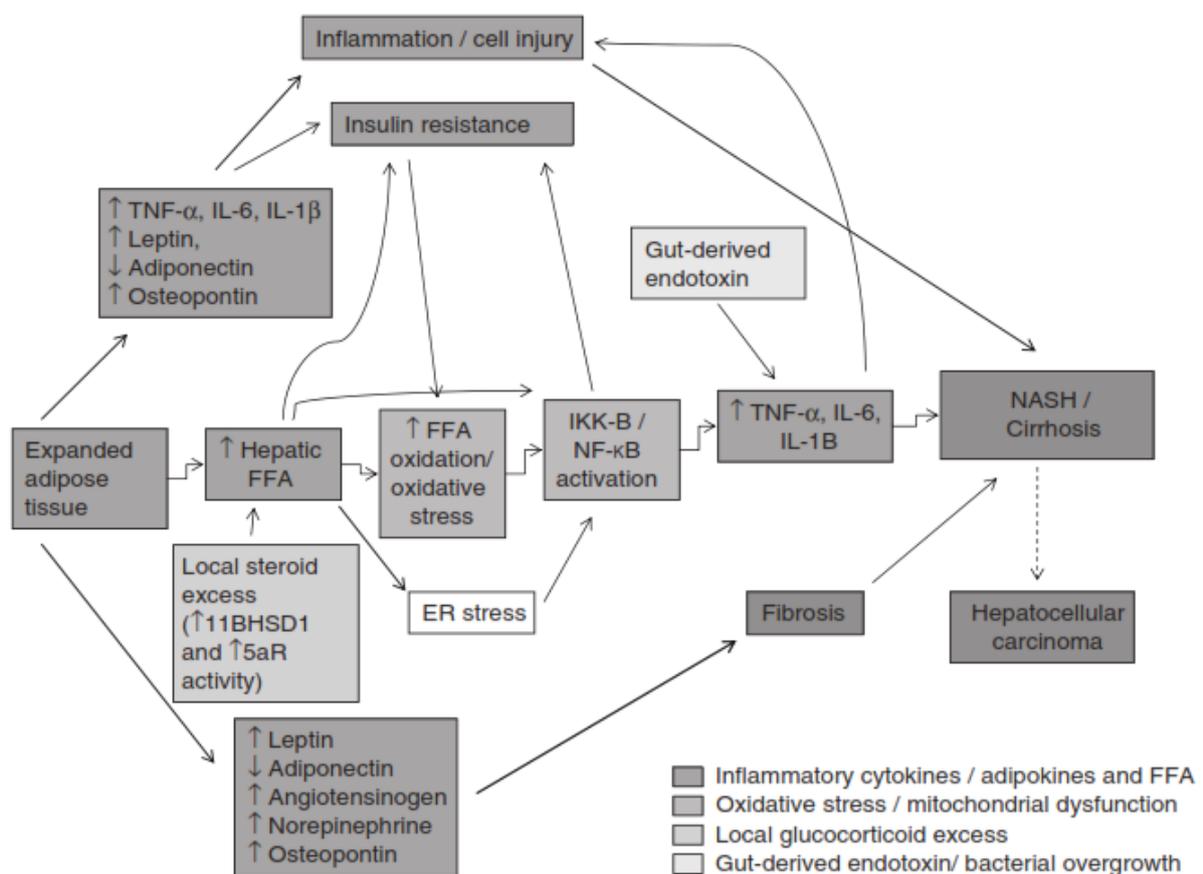


Figure 44 : Environnement inflammatoire dans la NASH (Dowman *et al.*, 2010). Le tissu adipeux produit des adipokines et des cytokines inflammatoires. L'accumulation de lipides intrahépatiques cause le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique, également sources de cytokines inflammatoires. L'ensemble de ces signaux inflammatoires contribue aux dommages cellulaires et au développement de la fibrose hépatique.

sévérité de l'inflammation est un élément prédicteur de la progression de la fibrose (Argo *et al.*, 2009). Le contexte inflammatoire a des origines multiples (Figure 44) (Dowman *et al.*, 2010).

Au centre des réactions inflammatoires se retrouve le facteur de transcription NF- κ B, grandement impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Au cours du développement de la NASH, cette voie peut être activée de différentes manières parmi lesquelles on retrouve des dysfonctions déjà évoquées plus haut. L'accumulation de lipides dans le foie a des effets lipotoxiques passant notamment par l'activation des récepteurs TLR4 et causant l'activation de la voie NF- κ B par une cascade de signalisation dédiée (Alkhoury *et al.*, 2009). Le stress persistant du réticulum endoplasmique conduit à l'apoptose mais aussi à l'activation de la voie NF- κ B (Xu, 2005). De manière plus générale, l'activation de NF- κ B est sensible aux cytokines telles que l'IL-6 et surtout au TNF- α , connu pour activer NF- κ B *via* une cascade de signalisation depuis les récepteurs aux TNF (Luedde and Schwabe, 2011). Or le TNF- α fait partie des cytokines produites par le tissu adipeux, au même titre que l'IL-1 β ou l'IL-6, responsables de l'inflammation systémique de bas grade observée dans l'obésité (Osborn and Olefsky, 2012).

NF- κ B a un éventail de fonctions lui permettant d'agir sur la fonction de différents types cellulaires. L'activation de cette voie va par exemple conduire à l'expression de molécules d'adhésion ou chémoattractantes comme VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ICAM-1 (InterCellular Adhesion molecule-1), ou MCP-1, responsables du recrutement des leucocytes circulants vers le foie (Cook-Mills *et al.*, 2011). La voie NF- κ B va également être responsable de la production de cytokines agissant à la fois la survie des hépatocytes, l'inflammation et l'activation des cellules de Kupffer et des cellules stellaires hépatiques (Luedde and Schwabe, 2011).

a. Cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie et sont responsables de la réponse immunitaire innée du foie. Leur localisation dans le

sinusoïde hépatique leur permet de phagocyter efficacement les pathogènes arrivant par la circulation sanguine (Figure 45) (Dixon *et al.*, 2013).

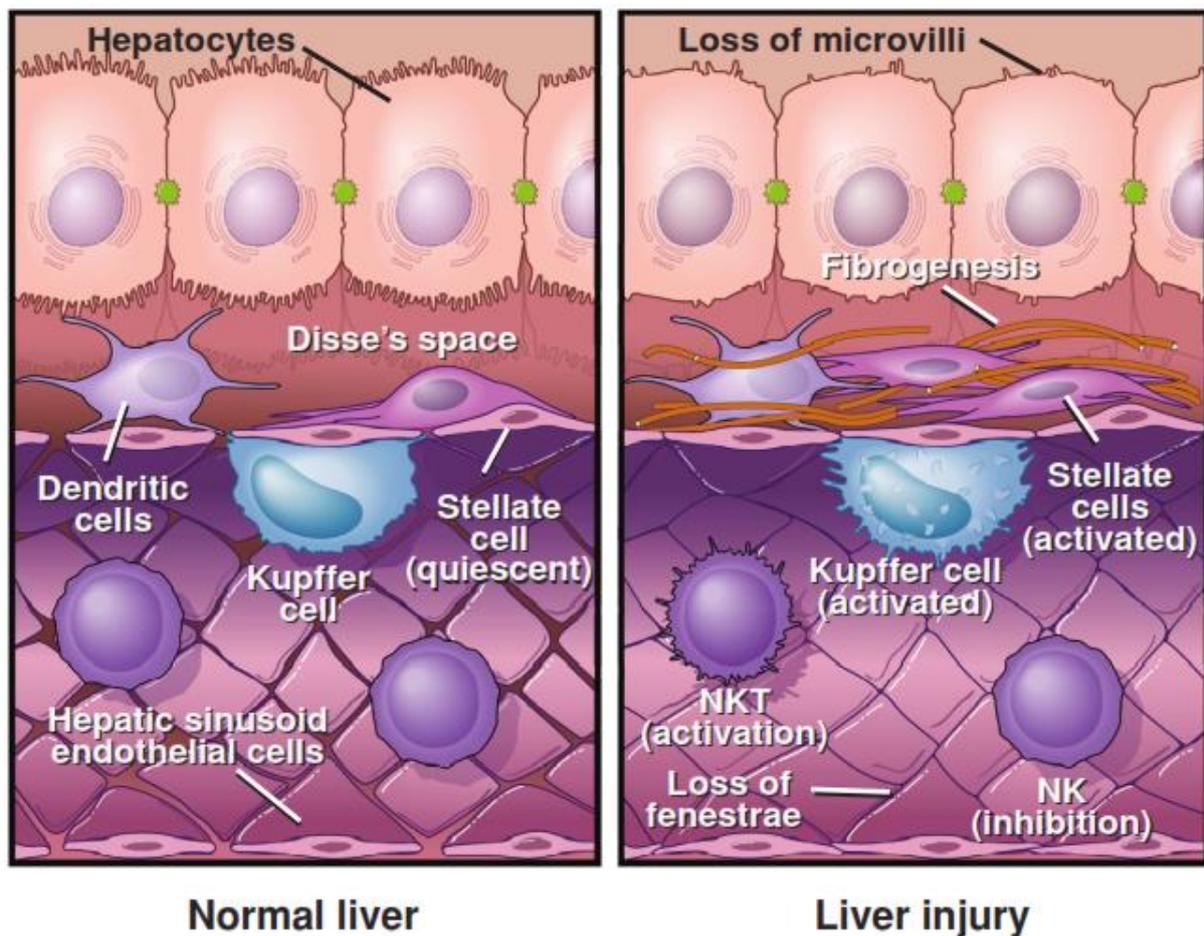


Figure 45 : Localisation des cellules de Kupffer au sein du sinusoïde hépatique (Dixon *et al.*, 2013).
 NK : Natural Killer ; NKT : Natural Killer T cells.

Les cellules de Kupffer servent également de barrière immunologique contre les particules immunogènes, tels que les lipopolysaccharides (LPS) et autres produits bactériens issus du tractus gastro-intestinal, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). Enfin, elles ont également un rôle important dans la clairance des cellules sanguines dégénérescentes. Les cellules de Kupffer (KC) ont ainsi un rôle hépatoprotecteur important, régulé par une balance inflammatoire précise. La dérégulation de cette balance fait partie intégrante du développement des maladies hépatiques comme les NAFLD (Dixon *et al.*, 2013; Nagy, 2015). Les KC étant au centre du système immunitaire inné du foie, elles vont être la cible de nombreuses stimulations inflammatoires au cours du développement de la pathologie. Parmi les signaux activateurs des KC, on retrouve

ainsi les PAMPs et le LPS provenant du tractus digestif, les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern), signaux provenant des hépatocytes endommagés,

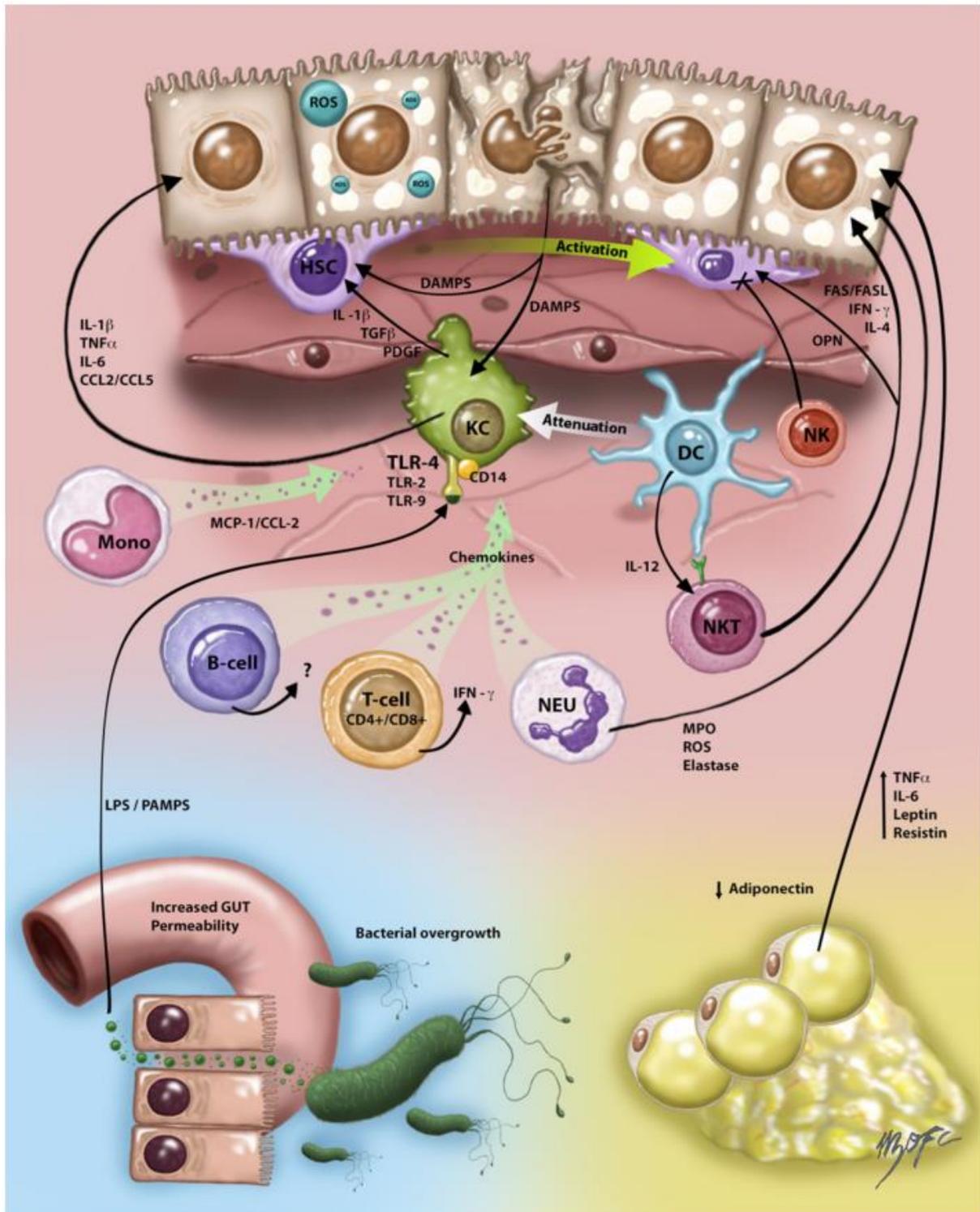


Figure 46 : La réponse immunitaire et inflammatoire dans la NASH (Arrese *et al.*, 2016). L'activation du système inflammatoire inné est primordiale dans la mise en place et l'amplification de l'inflammation hépatique dans le développement de la NASH. La surcharge de lipides ectopiques cause l'activation des cellule de Kupffer et des cellules stellaires hépatiques promouvant l'inflammation et la fibrose, respectivement.

mais aussi différentes cytokines et chémokines provenant du contexte inflammatoire environnant (Figure 46) (Arrese *et al.*, 2016).

L'activation de cellules de Kupffer est un élément clé dans la pathogenèse des NAFLD, et différentes études ont montré leur implication dans l'aggravation de la résistance à l'insuline et de la stéatose (Huang *et al.*, 2010; Lanthier *et al.*, 2011; Odegaard *et al.*, 2007). Ces effets s'expliquent par la production par les KC activées de nombreuses cytokines parmi lesquelles se trouvent l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF α , molécules proinflammatoires perturbant les fonctions hépatocytaires, et la sensibilité à l'insuline (Samuel and Shulman, 2012). De plus, l'activation des cellules de Kupffer va être déterminante pour la fibrogenèse par l'activation des cellules hépatiques stellaires (voir détails ci-dessous).

b. Fibrose et complications

La fibrose hépatique est le résultat de dommages chroniques subis par le tissu, elle intervient comme une forme de cicatrisation en réponse à la destruction progressive des hépatocytes. Si dans la plupart des cas elle est réversible avec l'arrêt des dommages, la persistance du stress peut causer le développement d'une cirrhose, considérée comme irréversible. De plus la fibrose hépatique et la cirrhose sont des facteurs de risque importants de développement de carcinome hépatocellulaire, un cancer primitif du foie. Il est estimé que 80% des carcinomes hépatocellulaires surviennent chez des patients ayant développé une fibrose ou une cirrhose hépatique (Fattovich *et al.*, 2004). Les cellules principalement responsables du développement de la fibrose sont les myofibroblastes hépatiques (HMF), issus de la différenciation des cellules stellaires hépatiques (HSC) (Friedman, 2004). Les cellules de Kupffer sont les principales responsables de la différenciation des cellules stellaires et myofibroblastes. En effet, une fois activées, les KC vont devenir une source importante de TGF- β (Transforming Growth factor β), déclencheur de la différenciation des HSC en HMF. De plus, après différenciation, les KC vont être responsables du maintien de la fibrogenèse en assurant l'activité et la survie des HMF *via* la production de cytokines comme l'IL-1 ou le TNF- α (Luedde and Schwabe, 2011). La fibrose pourra alors s'étendre peu à peu, parallèlement à la perte de fonctionnalité du foie et à l'exposition aux risques de développement de cirrhose ou d'hépatocarcinome.

3) Modèles animaux

Il existe de nombreux modèles animaux permettant de reproduire les caractéristiques des NAFLD (Sanches *et al.*, 2014). Toutefois il n'existe aucun modèle parfait, tous ont donc leurs avantages et leurs inconvénients. Les modèles de NAFLD peuvent être séparés en deux grandes catégories : les modèles nutritionnels et les modèles génétiques. Les résultats obtenus avec des modèles nutritionnels afin de développer des pathologies complexes comme les NAFLD sont variables selon l'âge, le sexe, la souche des animaux. De larges études menées par le *Jackson Laboratory* ont permis de montrer que les souris C57BL6 (mâles de surcroît) étaient la souche présentant la plus grande susceptibilité génétique au développement spontané de l'obésité et de la résistance à l'insuline (Grubb *et al.*, 2004). Associée à des régimes spécifiques cette caractéristique permet de développer de nombreux modèles mimant les désordres métaboliques humains.

1. Les régimes simulant une alimentation déséquilibrée

Les NAFLD sont étroitement liées à l'obésité et aux mauvais comportements alimentaires, ainsi les modèles les plus simples reposent sur la reproduction de ces habitudes alimentaires (Sanches *et al.*, 2014). Le modèle animal le plus couramment utilisé est le rongeur, rat ou souris, nourri avec un régime dont l'apport calorique est déséquilibré. Le plus connu est sans doute le régime HFD (High Fat Diet) à haute teneur en matière grasse. Dans ce genre de régime l'apport calorique provient de 45 à 75% des matières grasses, mais il existe de nombreuses variations de ces régimes. Il existe par exemple des régimes plus athérogéniques, avec du cholate et du cholestérol, des régimes présentant des taux élevés de sucres comme le fructose, ou encore des régimes dits *cafeteria* ou *western diet* directement constitués d'aliments tirés de la *junk food* humaine. Ces régimes, suivis sur un nombre suffisamment conséquent de semaines, vont induire une obésité, une résistance à l'insuline et des dommages hépatiques. Le régime HFD ayant été beaucoup utilisé, il est possible de trouver des études montrant dès 3 semaines de régime des résultats histologiques ressemblant à une NAFLD humaine avec

développement d'une stéatose moyenne (Lieber *et al.*, 2004). Toutefois pour arriver à des stades de NASH plus avancées, présentant des caractéristiques plus inflammatoires, et obtenir un phénotype plus représentatif du syndrome métabolique, il est nécessaire de prolonger le régime. Des souris C57BL/6 nourries pendant 28 semaines avec un régime HFD présentent d'importantes augmentations de l'expression de protéines inflammatoires comme MCP1, TNF α et même VCAM1 (Pathil *et al.*, 2012), toutefois cela ne conduit pas à une NASH sévère fibrosée. Une fibrose importante peut toutefois être observée avec un régime HFD. Une étude réalisée chez des rats Sprague Dawley nourris avec un régime HFD comme modèle de NASH, a par exemple mis en évidence l'apparition de débuts de fibrose après 16 semaines sur certains animaux. À partir de 36 semaines de régime une fibrose plus sévère est observable chez tous les animaux (Xu *et al.*, 2010).

Les modèles nutritionnels visant à reproduire une alimentation excessive et déséquilibrée dans ces apports caloriques permettent d'obtenir des résultats très proches de la pathologie humaine sans avoir recours à des souches d'animaux coûteuses, et sans traitements difficiles à mettre en œuvre. Toutefois cela nécessite un temps de régime important pour que la pathologie progresse dans ses stades les plus avancés, jusqu'à plus de 30 semaines pour obtenir un modèle de NASH avec fibrose.

2. Régime MCD

Le régime MCD (Methionine Choline Deficient) est l'un des autres modèles nutritionnels de NASH couramment utilisés. Comme son nom l'indique, ce modèle nutritionnel ne se base pas sur un apport important de gras ou de sucres mais sur une carence en méthionine et en choline. La méthionine, un acide aminé, et la choline, un nutriment, tous deux uniquement disponibles par des apports exogènes, alimentaires. La méthionine et la choline sont précurseurs de la phosphatidylcholine, le phospholipide responsable de la cohésion de la structure des VLDL. L'absence des précurseurs nécessaires à la formation de ces derniers va ainsi diminuer leur sécrétion (Machado *et al.*, 2015). Les VLDL étant responsables de l'export des lipides hépatiques, leur absence va participer à une accumulation

de lipides dans le foie. Par ailleurs, le déficit en méthionine va contribuer au stress oxydant et à l'inflammation hépatique en diminuant notamment les quantités de glutathion (Caballero *et al.*, 2010). De plus, elle est elle-même un intermédiaire de la biosynthèse de la phosphatidylcholine.

Le régime MCD induit moins de stéatose qu'un régime Western mais il va causer plus de dommages hépatiques (Machado *et al.*, 2015). Il a l'avantage d'être très reproductible et d'entraîner ces dommages plus rapidement que les autres modèles nutritionnels. En effet, dès 4 semaines, les enzymes hépatiques sériques, ALT et AST, sont grandement augmentées, la stéatose s'est développée et les marqueurs inflammatoires hépatiques, comme MCP-1, TNF- α , CCR2, mais aussi VCAM-1 sont augmentés (Ip *et al.*, 2004b, 2004b; Pathil *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009). Toutefois, si ce régime présente l'avantage de causer des dommages hépatiques similaires à ceux observés pour une NASH humaine avancée, il ne reprend pas les caractéristiques du syndrome métabolique. Ainsi, alors que les autres types de régime vont induire une prise de poids, causer une obésité et une insulino-résistance, le régime MCD provoque plutôt une perte de poids. Cette perte de poids est même importante et observable dès la première semaine de régime. Les mécanismes de perte de poids induite par le régime MCD ne semblent pas totalement élucidés, toutefois il a été montré que des souris sous régime MCD présentaient une déficience en SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase) (Machado *et al.*, 2015). Or il a été montré que SCD1 avait la capacité d'augmenter la β -oxydation en promouvant l'expression des gènes de l'acyl-CoA oxydase ou de CPT-1. À l'opposé, les gènes de SREBP-1, FAS ou GPAT étaient réprimés conduisant à une baisse de la synthèse des triglycérides (Ntambi *et al.*, 2002). Ensemble ces données tendent à montrer une activation du métabolisme lipidique tout en diminuant la formation de tissu adipeux, ce qui pourrait expliquer la perte de poids des souris sous régime MCD.

Au final le régime MCD présente des différences importantes avec certaines caractéristiques évidentes de la pathologie humaine en lien avec le syndrome métabolique. Toutefois, il présente l'avantage de causer de manière reproductible et rapide des dommages hépatiques similaires à ceux observés dans les stades plus

avancés de NASH humaines. Ainsi ce régime, même s'il n'est pas très représentatif du développement naturel de la NASH, permet de s'intéresser aux mécanismes pro-inflammatoires et aux mécanismes d'apparition des dommages hépatiques.

3. Modèles génétiques

Comme précédemment avec les modèles nutritionnels, l'une des premières approches abordées par les modèles génétiques de NASH est celle du syndrome métabolique. Ainsi les modèles les plus classiques sont ceux permettant de rendre les animaux obèses et insulino-résistants. Les modèles les plus connus sont les souris *ob/ob*, *db/db* et les rats *Zucker*, présentant tous une mutation en lien avec la signalisation à la leptine. Les souris *db/db* et les rats *Zucker* présentent une mutation du récepteur à la leptine perturbant l'affinité du récepteur et la signalisation en aval. Les souris *ob/ob* quant à elles présentent une mutation du gène de la leptine causant un déficit de la synthèse de l'hormone. Les animaux de ces trois souches sont obèses, hyperphagiques, insulino-résistants et développent spontanément une stéatose hépatique.

Toutefois si ces modèles conduisent rapidement au développement d'une stéatose hépatique, ils n'évoluent pas spontanément vers une stéatohépatopathie plus avancée. Il a été montré que la leptine avait un rôle important dans la fibrogenèse hépatique, notamment dans l'expression du collagène-I, en réponse aux anomalies hépatiques causées par la stéatose (Leclercq *et al.*, 2002). De plus, la leptine semble avoir un rôle dans l'exacerbation de la réaction inflammatoire hépatique en modulant l'activité de TGF β 1, important dans le contrôle de l'apoptose et du système inflammatoire (Leclercq *et al.*, 2002). Le rétablissement des concentrations physiologiques de leptine permet de restaurer la fibrogenèse et les phénomènes inflammatoires.

Si ces mutations génétiques ne permettent pas la progression spontanée vers la NASH, une stimulation supplémentaire servant de "second hit" permet de la provoquer. Ces animaux obèses ont par exemple montré une sensibilité plus importante à une hépatotoxicité induite par l'exposition à de faibles quantités de lipopolysaccharides (LPS) (Yang *et al.*, 1997). Des cytokines régulant l'activité de

TNF α sont dérégulées chez ces animaux obèses, provoquant la mise en place de l'inflammation hépatique causant l'évolution de la stéatose hépatique en stéato-hépatopathie.

Afin de provoquer l'évolution de la stéatose vers la NASH, il est également possible de combiner les modèles génétiques et nutritionnels. Nourrir des rats Zucker avec un régime HFD permet d'induire une fibrose et une inflammation accompagnées d'une production importante de ROS (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005). L'utilisation d'un régime MCD chez des souris *db/db* permet également d'obtenir une NASH de manière reproductible en 4 semaines (Sahai, 2004). Si la durée de régime nécessaire est la même qu'avec un régime MCD seul, la combinaison du fond génétique et du régime permet par contre d'obtenir une NASH mimant au mieux la NASH humaine. Le fond génétique permet d'obtenir l'obésité et l'insulinorésistance non observables avec un régime MCD seul.

Outre les modèles de sélection génétique reprenant les caractéristiques du syndrome métabolique, il existe aussi des modèles modulant l'activité de certains gènes. Parmi ces derniers, il est possible de citer le modèle de souris surexprimant SREBP-1c (Strable and Ntambi, 2010). SREBP-1c est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des adipocytes. Un modèle de souris transgéniques a été créé, surexprimant SREBP-1c dans les tissus adipeux grâce à un promoteur spécifique. Le résultat est une lignée de souris souffrant de lipodystrophie accompagnée d'une insulinorésistance et une hyperglycémie. Ces souris souffrent également de stéatose hépatique importante dès la naissance. À 30 semaines ces souris présentent une inflammation, une nécrose et une fibrose hépatique caractéristiques de la NASH humaine (Nakayama *et al.*, 2007). Toutefois si ce modèle développe spontanément les lésions de la NASH, il n'est pas représentatif du contexte humain de la NASH. Les souris transgéniques pour SREBP-1C étant lipodystrophiques, elles n'ont pas de graisse viscérale, donc pas d'obésité.

Pour résumer, il existe autant de modèles de NASH potentiels que de modèles d'insulinorésistance et/ou d'obésité, toutefois tous ces modèles ne permettent pas de reproduire toutes les caractéristiques de la NASH humaine dans ses stades avancés. Il existe alors des modèles, éventuellement plus éloignés

de la pathogénèse humaine, mais permettant de reproduire au mieux les dommages hépatiques de la pathologie humaine (Figure 47) (Sanches *et al.*, 2014). De plus, les délais de développement de la pathologie sont variables selon les modèles. En bref, et comme aucun modèle animal n'est parfait, le choix du modèle doit se faire en fonction des besoins de l'étude mais aussi de la durée allouée à cette dernière. Pour l'étude présentée ici c'est le modèle de NASH induite avec un régime MCD qui a été choisi pour la rapidité de la pathogénèse et le développement d'une inflammation hépatique marquée.

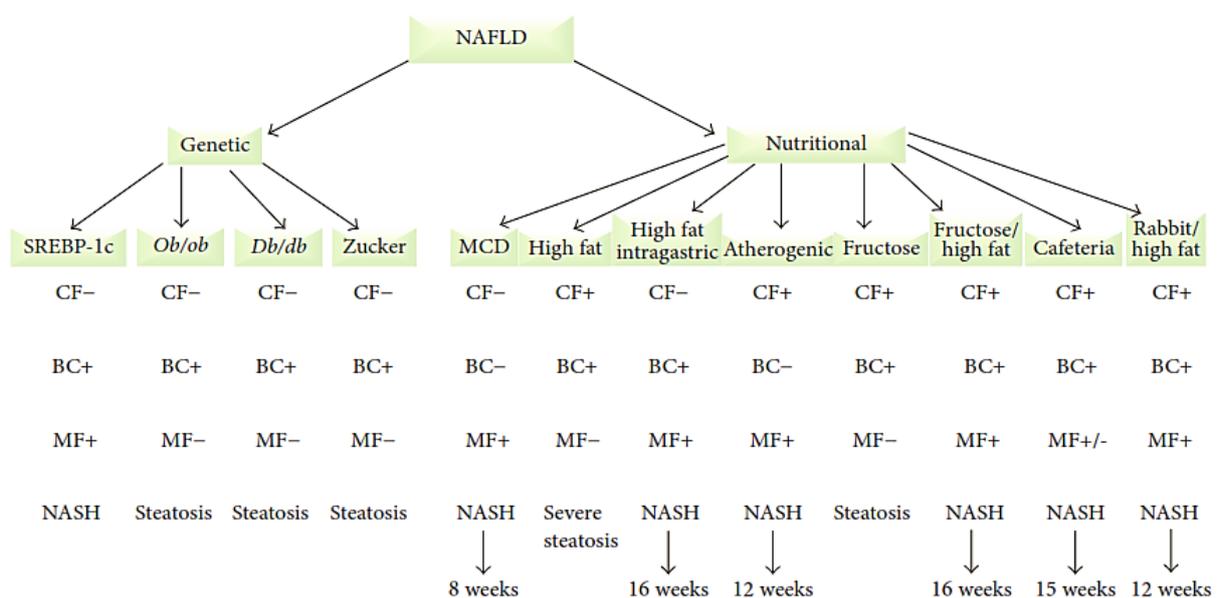


Figure 47 : Différents modèles animaux, génétiques et nutritionnels, de NAFDL et leurs caractéristiques respectives (Sanches *et al.*, 2014).

4) Outils diagnostiques

Les premiers symptômes apparaissent tardivement dans le développement de la maladie, de plus ceux-ci sont plutôt aspécifiques (fatigue, perte de poids...). Le plus souvent, le motif de consultation à l'origine du dépistage de la pathologie sera un mauvais bilan sanguin, révélant des niveaux trop élevés d'enzymes hépatiques (Alanine aminotransférase (ALT), Aspartate aminotransférase (AST), Gamma Glutamyl Transpeptidase (γ -GT), Phosphatase Alcaline (PAL)), ou même l'apparition d'une autre atteinte hépatique comme une hépatite virale ou une hépatomégalie. Afin de diagnostiquer la NASH, il est alors nécessaire d'écartier

toute autre cause d'hépatopathie chronique comme la consommation d'alcool ou de substances médicamenteuses hépatotoxiques. Ensuite s'il y a présence de facteurs de risque (obésité, diabète de type 2, résistance à l'insuline), la méthode diagnostique de référence reste la biopsie hépatique.

1. La biopsie hépatique

La biopsie hépatique permet, grâce à une aiguille transdermique, de collecter un échantillon de tissu qui permettra, grâce à des observations histologiques au microscope, de caractériser l'atteinte du tissu hépatique. Un système de notation a été établi et accepté par le CNR (Clinical Research Network) en 2005 afin d'établir un score histologique permettant de conclure quant au développement d'une NASH et de son avancée (Kleiner *et al.*, 2005) (Tableau 5 et figure 48). Ce score se base sur l'observation de 3 types de modifications cellulaires : la présence de stéatose, d'inflammation lobulaire et de ballonnisation hépatocytaire.

Tableau 5 : Système de notation histologique de la NASH selon le clinical Research Network.

Degré d'activité de la NASH: degré = score total: S + L + B (range 0–8)					
Stéatose	S score	Inflammation lobulaire	L score	Ballonnisation hépatocytaire	B score
< 5%	0	Aucune	0	Aucune	0
5–33%	1	< 2	1	Peu de cellules ballonnées	1
34–66%	2	2–4	2	Nombreuses cellules ballonnées	2
> 66%	3	> 4	3		
Stade de la fibrose de la NASH				Stade	
Aucune				0	
Légère, fibrose périsinusoïdale zone 3				1a	
Modérée, fibrose périsinusoïdale zone 3				1b	
Fibrose portale/periportale uniquement				1c	
Fibrose périsinusoïdale et portale/périportale Zone 3				2	
Ponts fibreux (porto-portaux)				3	
Cirrhose				4	

Source: Kleiner et al., Hepatology 2005;41:1313–21 [35].

La stéatose est facilement identifiable par la présence de vacuoles lipidiques prenant rapidement une place importante au sein du tissu hépatique. Le ballonnement quant à lui est une manifestation de mort cellulaire des hépatocytes.

Les cellules endommagées apparaissent alors gonflées, avec de gros cytoplasmes clairs. Ces cellules peuvent être confondues avec des vacuoles lipidiques, toutefois elles s'en différencient par l'aspect granuleux de leur cytoplasme et par la présence d'un noyau central (Kleiner *et al.*, 2005) (Figure 49 : (A) stéatose sans ballonnement, (B) stéatose et faible ballonnement cellulaire avec des hépatocytes de taille normale, (C) ballonnement important). La fibrose, si elle ne fait pas partie de la définition histologique de la NASH, reçoit toutefois un score qui sera un

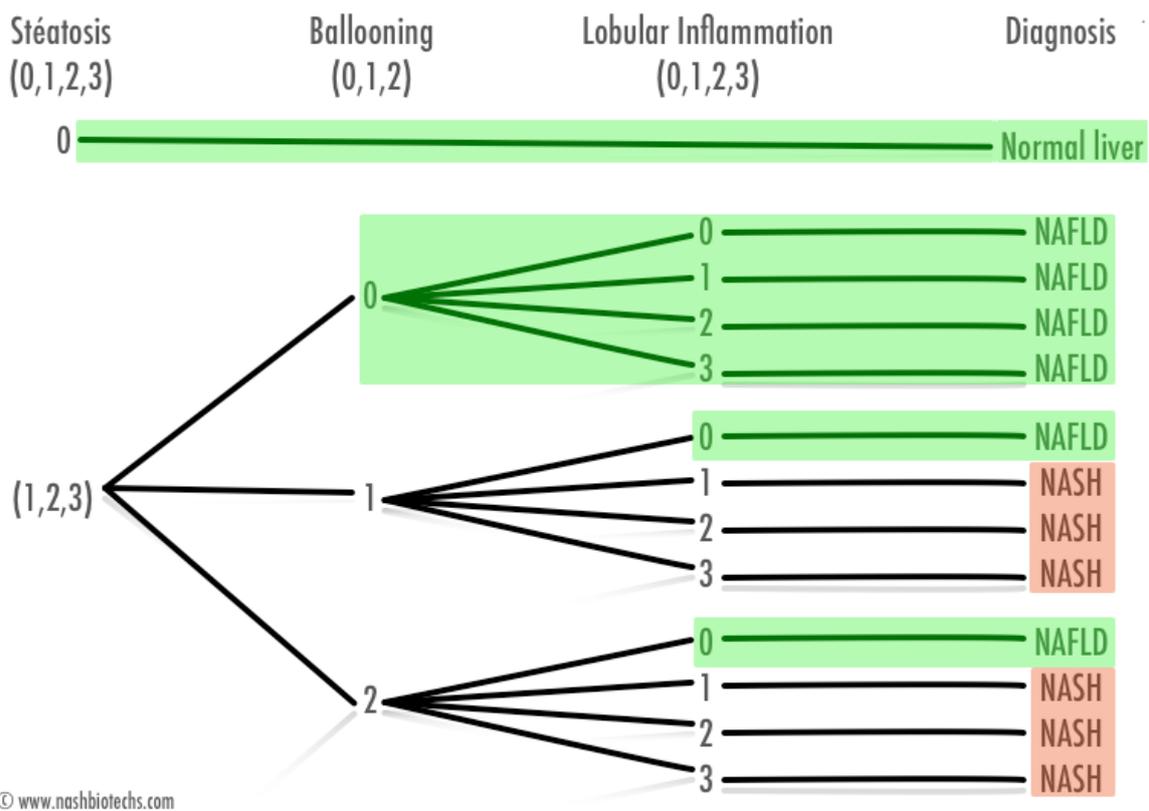


Figure 48 : Critères de diagnostic basés sur l'observation histologique pour le diagnostic de la NASH.

facteur prédictif du pronostic d'évolution de la maladie.

Si la biopsie hépatique reste la méthode de référence de diagnostic de certitude elle n'est toutefois pas dénuée d'inconvénients. En effet, il s'agit d'un geste invasif, non sans danger, pouvant avoir des effets secondaires non négligeables, notamment des problèmes d'hémorragies. De plus, la biopsie hépatique ne consistant qu'en un prélèvement ponctuel de tissu, son analyse ne sera pas forcément représentative de tout l'organe. Malgré la présence d'un score standardisé pour la gradation de la pathologie, l'analyse reste cependant visuelle

et la seule appréciation de l'anatomopathologiste fera foi, pouvant ainsi impacter la reproductibilité interindividuelle.

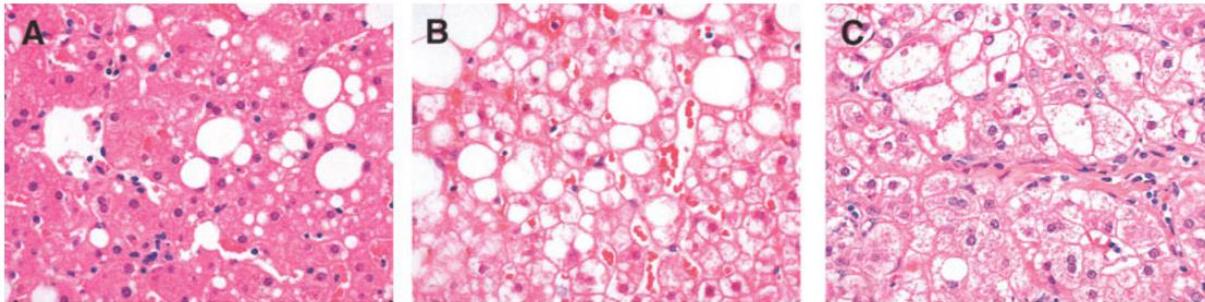


Figure 49 : Exemple représentatif de coupe histologiques de foie présentant les caractéristiques cellulaires permettant l'établissement d'un score histologique. A : stéatose sans ballonnement, B : stéatose et faible ballonnement cellulaire avec des hépatocytes de taille normale, C : ballonnement important.

2. Les biomarqueurs

De nombreux biomarqueurs sont applicables pour le screening des NAFLD. L'IMC, le tour de taille ou encore la pression artérielle sont les premières indications pour le classement de patients à risques ou non, le syndrome métabolique étant très fréquemment lié aux NAFLD. Ensuite les enzymes hépatiques AST et ALT (aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase) sont parmi les biomarqueurs sanguins les plus couramment dosés. Mais si une élévation chronique de leur niveau plasmatique est un bon indicateur de dysfonctionnement hépatique, elles ne sont toutefois pas un indice prédictif infaillible. En effet, diverses études ont montré que dans environ 80% des cas de NAFLD les niveaux plasmatiques d'AST et ALT restaient à des valeurs normales (Adams *et al.*, 2005; Browning *et al.*, 2004). La valeur prédictive individuelle des différents biomarqueurs reste alors assez faible. Toutefois différentes techniques de score ont été mises en place afin de combiner les informations fournies par les biomarqueurs et d'autres paramètres biologiques afin d'obtenir des techniques de diagnostics prédictives. Ces différents scores et leurs compositions sont présentés brièvement tableau 6 (Hassan, 2014).

Tableau 6 : Différents scores, basés sur des biomarqueurs, et prédictifs de l'état d'avancement des NAFLD (Hassan, 2014).

	NAFLD Fibrosis Score	Fibrotest	FIB-4	ELF	BARD	NICE	NASH test
Age	×	×	×	×			×
BMI	×				×		
AST	×		×		×		×
ALT	×		×		×	x	×
Platelet Count	×		×				
Albumin	×						
α 2-MG		×					×
Total bilirubin		×					×
Apo A1		×					×
GGT		×					×
PIIINP				×			
HA				×			
TIMP				×			
DM					×		
MS						×	
CK-18						×	
Sex							×
Height							×
Weight							×
HG							×
TGL							×
CL							×

α 2-MG: α 2 macroglobulin; ALT: Alanine aminotransferase; ApoA1: Apolipoprotein A1; AST: Aspartate aminotransferase; BMI: Body mass index; CK-18: Cytokeratin-18; CL: Cholesterol levels; DM: Diabetes mellitus; ELF: European Liver Fibrosis Test; GGT: Gamma-glutamyl transpeptidase; HA: Hyaluronic acid; HG: Haptoglobin; MS: Metabolic syndrome; PIIINP: Aminoterminal propeptide of type III collagen; TGL: Triglyceride levels; TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis.

Parmi ces différents scores, les plus utilisés et les plus précis sont sans doute le NAFLD fibrosis score, le Fibrotest et le ELF (European Liver Fibrosis test) (Tableau 7) (Hassan, 2014). Le NAFLD fibrosis score par exemple prend en compte l'âge, l'IMC (Indice de Masse Corporelle), le ratio AST/ALT, le dosage des plaquettes et de l'albumine. En 2007 une étude a montré l'efficacité de ce score sur une cohorte de 733 patients avec une AUROC (Area Under Receiver Operating Characteristic curve) de 0,84, une sensibilité de 82% et une spécificité de 98% (Angulo *et al.*, 2007). Toutefois sa faiblesse réside dans un système de classification de la probabilité de fibrose en trois classes : faible probabilité, forte probabilité et indéterminé. Ainsi, malgré les bons résultats obtenus avec ce test, environ 25% des patients ont reçu le statut indéterminé.

Tableau 7 : Analyse statistique des différentes méthodes de *scoring* des NAFLD (Hassan, 2014).

	NAFLD fibrosis score	Fibrotest	FIB-4	ELF	BARD	NICE	NASH test
AUROC	0.84	0.75-0.86	0.86	0.87	0.81	0.88	0.79
Sens (%)	82	77	85	89		84	33
Spec (%)	98	98	65	96		86	94
PPV (%)	90	90	36	80	43	44	66
NPV (%)	93	73	95	98	96	98	81

NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease; AUROC: Area under the receiver operating characteristic curve; ELF: European Liver Fibrosis Test; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; Sens: Sensitivity; Spec: Specificity; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis.

En France, et depuis 2006, l'HAS (Haute Autorité pour la Santé) recommande l'utilisation du Fibrotest comme méthode de première ligne d'évaluation de la fibrose dans le cadre de l'hépatite C. Son utilisation semble s'élargir peu à peu pour le diagnostic de la NASH. Le Fibrotest est une méthode de scoring brevetée depuis 2001 par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. Le Fibrotest se base sur le calcul d'un score de 0 (absence de fibrose) à 1 (cirrhose), grâce à une équation comprenant le dosage de 6 biomarqueurs : α 2 macroglobuline, haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine totale, γ -GT et ALT. Le tout est ajusté à l'âge et au sexe du patient. Le Fibrotest est généralement associé à un autre score, l'Actitest, qui en se basant sur des paramètres communs va attribuer un score de 0 à 1 à l'activité nécrotique et inflammatoire. Comme le NAFLD fibrosis score, le Fibrotest a fait l'objet de publications validant son acuité et mettant en avant des points faibles similaires (Ratziu *et al.*, 2006; Lassailly *et al.*, 2011). Un AUROC entre 0,75 et 0,86, une sensibilité de 77% et une spécificité de 98%. Toutefois, comme pour le NAFLD fibrosis score, une certaine proportion de patients a comme résultat du test un statut "indéterminé".

Ces tests présentent ainsi des avantages indéniables et permettent à une grande proportion de patients d'éviter la biopsie. Une fois la NAFLD décelée grâce aux facteurs de risques et aux biomarqueurs, différentes techniques d'imagerie médicale se proposent comme une alternative à la biopsie hépatique. Ces techniques présentent l'avantage de pallier à au moins deux inconvénients de la biopsie hépatique : le caractère invasif et l'impossibilité d'analyser l'ensemble du foie.

3. Le scanner à rayons X

L'évaluation de la stéatose hépatique peut être réalisée grâce à la tomodensitométrie (Computed Tomography : CT). Cette analyse se base sur l'étude de l'atténuation du signal dans le foie par rapport à d'autres organes, notamment la rate. Plus la stéatose est importante moins l'atténuation sera grande, le foie deviendra plus clair à l'image (Figure 50) (Lee, 2014).

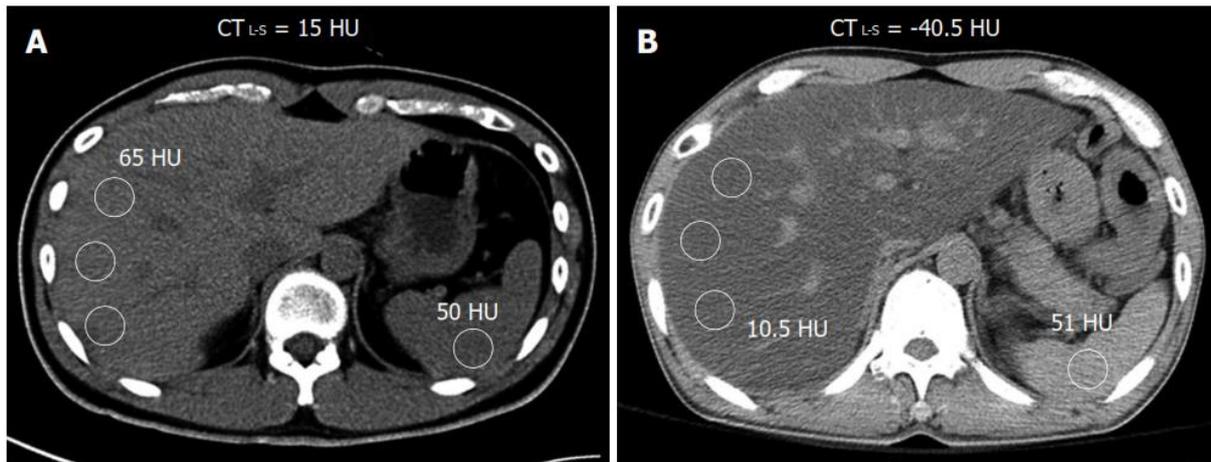


Figure 50 : Evaluation de la stéatose hépatique par scanner à rayons X. A : Foie normal, l'atténuation mesurée est de 65 HU dans les zones d'intérêt (cercles blancs à gauche). L'atténuation est inférieure pour la rate (50 HU, zone d'intérêt à droite de l'image). B : Foie stéatosé, l'atténuation de la rate (51 HU) est supérieure à celle du foie (10,5 HU) (Lee, 2014).

Différents protocoles d'imagerie CT ont été évalués afin de déterminer le meilleur moyen d'obtenir un ratio foie/rate permettant la discrimination des patients selon leur niveau de stéatose. En 2010, par exemple, une étude a montré sur 179 patients, soumis à des acquisitions CT et une biopsie hépatique le même jour, qu'une imagerie classique était équivalente à une imagerie améliorée par l'injection d'un produit de contraste pour grader la stéatose hépatique (Kim *et al.*, 2010). L'imagerie sans produit de contraste est alors préférée car elle permet également de s'affranchir de facteurs variables comme par exemple la vitesse, le volume d'injection du produit de contraste et le timing d'acquisition à adapter à ces paramètres. Plusieurs "indices" ont été envisagés pour classifier le niveau de stéatose hépatique, le plus simple étant la valeur brute d'atténuation du foie en unité Hounsfield (UH). Cependant, la méthode de mesure préférée reste la soustraction de l'atténuation splénique à l'atténuation hépatique. Ce calcul permet alors d'utiliser l'atténuation splénique comme contrôle interne gommant les

erreurs et variations de mesures possibles entre les différents modèles de scanners à rayons X par exemple. Différentes études ont alors montré des niveaux de sensibilité et de spécificité satisfaisants pour cet indicice (82% et 100% respectivement sur une cohorte de 154 patients par exemple (Park *et al.*, 2006) ou encore 72,7% et 91,3% (Lee *et al.*, 2010)). Si ces valeurs sont satisfaisantes elles semblent aussi variables, à l'instar des seuils adoptés dans chacune des études, mais dans tous les cas la précision du diagnostic diminue proportionnellement avec le niveau de stéatose. L'évaluation de la stéatose hépatique grâce au CT serait ainsi moins pertinente chez des patients ne présentant pas de stéatose avancée. De plus, il manque des données quant à la possibilité de suivre de manière longitudinale des changements dans les niveaux de stéatose hépatique. Mais de par son caractère irradiant, le CT ne pourrait être recommandé pour un suivi de longue durée chez des patients atteints de NAFLD.

4. Les ultrasons

a. Imagerie B-mode (Brightness Mode)

L'utilisation la plus connue des ultrasons pour le diagnostic reste l'imagerie classique en niveau de gris (B-mode). Toutefois pour le diagnostic des NAFLD son utilité reste assez limitée. L'imagerie en B-mode permet d'évaluer, de manière qualitative, la stéatose hépatique en se basant notamment sur une comparaison de l'échogénicité du foie avec celle du rein. En cas de stéatose avancée le foie deviendra alors plus clair que ce dernier. Si cette technique présente une sensibilité élevée (> 80%) pour des niveaux de stéatose supérieurs à 30%, elle reste cependant peu fiable pour des niveaux de stéatose inférieurs (Lee *et al.*, 2010). De plus, cette méthode se base sur des critères qualitatifs visuels pouvant varier d'un observateur à l'autre, néanmoins elle a le mérite d'être peu coûteuse et le matériel est facile d'accès. Ainsi si l'imagerie B-mode ne peut pas être utilisée comme un outil de caractérisation précis de la maladie et de sa progression, sa simplicité et sa disponibilité en font une méthode de choix pour le screening de première ligne chez des patients présentant des bilans sanguins anormaux.

b. L'élastographie

Un autre moyen d'utilisation des ultrasons semble plus prometteur pour le diagnostic et surtout le suivi des NAFLD et ses évolutions, il s'agit de l'élastographie. Les ultrasons ne sont ici plus utilisés pour l'obtention d'images anatomiques mais permettent de caractériser l'élasticité d'un tissu. Cette technique se base sur la vitesse de propagation d'une onde dans les tissus. Plus le tissu sera rigide (présence de fibrose dans le cas du foie atteint de NASH) plus l'onde sera propagée rapidement. Dans le cadre de l'élastographie, les ultrasons peuvent alors être utilisés de deux façons : pour la mesure de la vitesse de propagation de l'onde dans le tissu et/ou pour la création de cette même onde.

Le Fibroscan

La technique la plus connue et la plus utilisée aujourd'hui est une technologie d'origine Française, Le Fibroscan (marque déposée par EchoSens, Paris). Le Fibroscan est un outil dit d'Elastographie Impulsionnelle à Vibration Contrôlée (VCTE). Elle offre une mesure quantitative, reproductible et immédiate de l'élasticité tissulaire (en kilopascal, kPa). Pour cela la sonde utilisée par le Fibroscan est dotée à son extrémité d'un petit vibreur mécanique diffusant une onde de cisaillement qui traverse les tissus jusqu'au foie. La tête de la sonde est également équipée d'un système à ultrasons qui va, par effet doppler, mesurer la vitesse de propagation de l'onde créée par le vibreur (Figure 51, adaptée du site internet de la société EchoSens).

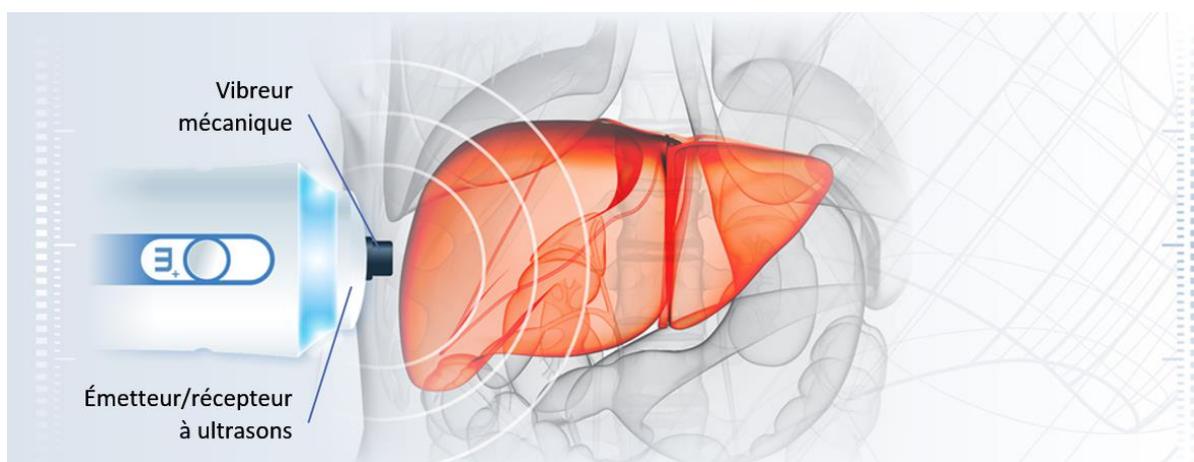


Figure 51 : Représentation illustrée du fonctionnement du Fibroscan (d'après EchoSens). Le vibreur provoque une onde mécanique à travers les tissus jusque dans le foie. La vitesse de propagation de l'onde mécanique est mesurée grâce aux ultrasons.

Ce procédé est donc très simple à mettre en œuvre, ne nécessite pas d'autre matériel que le Fibroscan en soit, et il est disponible sous différents formats dont certains sont très compacts et mobiles. Le patient doit simplement être à jeun depuis au moins 2 heures afin d'éviter les éventuelles perturbations avec les mesures. L'examen dure environ 10 minutes, nécessite que le patient soit allongé sur le dos, le bras relevé. L'appareil est alors placé dans un espace intercostal afin de se trouver au niveau du lobe droit du foie. Un examen standard est composé en général d'une dizaine de mesures réussies à 70%. Des *cutoff* (en kPa) ont été mis en place et permettent ainsi d'établir un diagnostic immédiatement après l'examen. Différentes études ont mis à l'épreuve cette technique et établi des *cutoff* pour les différentes pathologies éligibles à un examen Fibroscan (comme les hépatites, cirrhose biliaire ou encore la cholangite sclérosante primitive et bien sûr la NASH), et ce, pour le diagnostic de la fibrose et de la cirrhose. Dans le cadre des NAFLD, le *cutoff* a été placé à 7 kPa pour la fibrose et 10,5 kPa pour la cirrhose. Si les valeurs de spécificité sont moins bonnes pour les NAFLD que pour l'hépatite C, pour laquelle le Fibroscan est d'ailleurs devenu une des techniques de diagnostic de référence, elles restent toutefois très bonnes avec une spécificité de 0,76 et 0,78 pour le diagnostic de la fibrose et la cirrhose respectivement, et une sensibilité de 0,78 et 0,96 (Gaia *et al.*, 2011). Dans les cas d'obésité (IMC >30 kg/m²), ces valeurs chutent drastiquement et le diagnostic perd grandement en fiabilité. Ce résultat est dû à une couche de graisse abdominale plus importante défavorable à l'analyse par ultrasons. Une sonde XL a alors été développée pour palier à ce problème non négligeable étant donnée la proportion importante d'obèses dans la population susceptible aux NAFLD. Si les valeurs de *cutoff* changent avec cette nouvelle sonde, les valeurs de spécificité, de sensibilité ainsi que le taux de réussite des mesures sont grandement améliorés avec la sonde XL chez les patients obèses (de Lédighen *et al.*, 2012).

L'ARFI

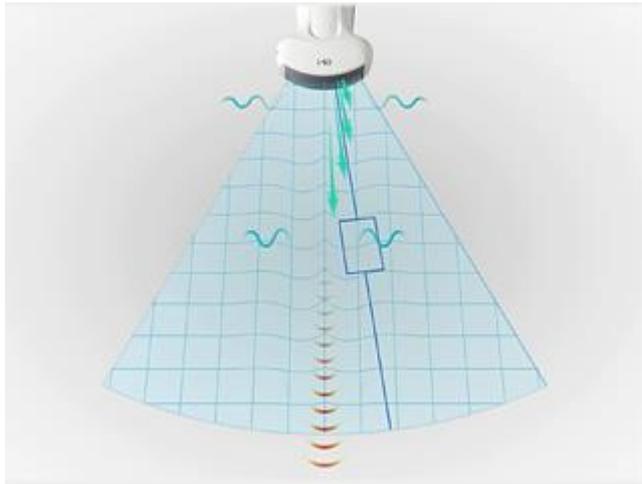


Figure 52 : Principe de l'élastographie à impulsion acoustique. Une impulsion ultrasonore permet la création d'une onde de cisaillement dans le tissu. La mesure de la vitesse de propagation de cette dernière renseigne sur la rigidité du tissu (d'après Philips ElastPQ).

Une autre technologie d'élastographie impulsionnelle permet de quantifier les propriétés mécaniques d'un tissu, il s'agit de l'ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse), ou élastographie à impulsion acoustique. Elle se base sur le même principe de mesure que le Fibroscan, la mesure de la vitesse d'une onde dans le tissu. Toutefois, contrairement à ce dernier elle n'utilise pas une impulsion mécanique pour propager l'onde mais une impulsion ultrasonore. Cette

technique présente l'intérêt de pouvoir être intégrée dans un équipement standard permettant de réaliser simultanément, avec une même sonde, un examen échographique abdominale standard et un examen élastographique. Sur l'imagerie abdominale B-mode standard il est alors possible de positionner une zone d'intérêt dans laquelle l'impulsion ultrasonore sera envoyée. La propagation de cette impulsion dans le tissu va alors générer, perpendiculairement à cette dernière, des ondes de cisaillement. La vitesse de propagation de ces dernières est mesurée grâce à un balayage ultrasonore très rapide (jusqu'à 20000 images/s), toujours par la même sonde à ultrasons (Figure 52 d'après Philips ElastPQ). À partir de la vitesse de propagation des ondes il est alors possible d'établir une cartographie en échelle de couleur de la dureté du tissu situé dans la région d'intérêt (SWI : Shear Wave Imaging) (Figure 53) (Frulio and Trillaud, 2013).

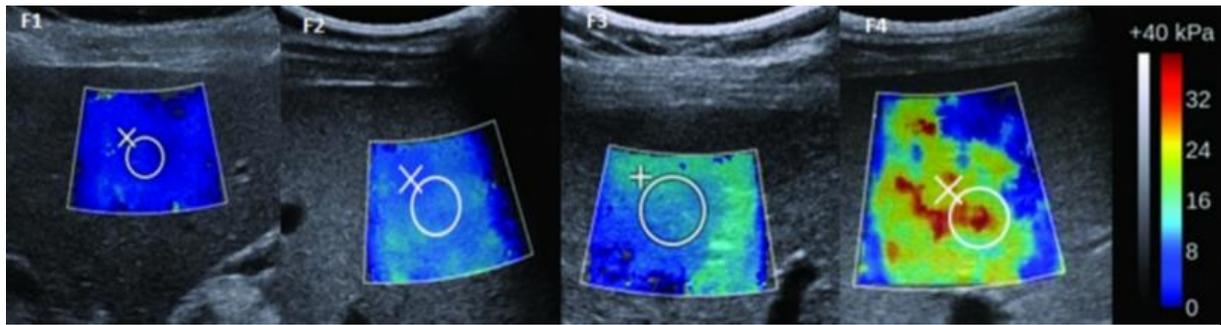


Figure 53 : *Shear Wave Imaging* (SWI) : stades d'évolution croissants (de droite à gauche) de la fibrose hépatique, en échelle de couleurs (Frulio and Trillaud, 2013).

Cette technique est une innovation française, rendue possible pour la première fois en 2005 grâce au dispositif d'imagerie ultrasonore Aixplorer et à l'expertise de la société dans le domaine de l'acquisition ultrasonore ultra rapide (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence). C'est cette vitesse d'acquisition qui permet de mesurer les ondes de cisaillement dont la vitesse peut atteindre 10 m/s, rendant ainsi l'acquisition quasi instantanée, et permettant d'ignorer les interférences causées par les mouvements du patient ou de l'opérateur. De plus la présence d'un B-mode simultanément à la mesure d'élasticité facilite l'apprentissage de la technique et sa reproductibilité, à la fois intra et inter-opérateur (Ferraioli *et al.*, 2012).

Une étude clinique a montré l'efficacité de cette technique diagnostique sur une cohorte de 113 patients atteints d'hépatite C pour l'évaluation du niveau de fibrose (Bavu *et al.*, 2011). Il a été montré que le SWI avait une précision supérieure au Fibroscan grâce à une zone hépatique étudiée plus importante avec le SWI qu'avec le Fibroscan. Toutefois ces deux méthodes ont été comparées à un score de prédiction obtenu par marqueurs biochimiques, la biopsie hépatique n'ayant été réalisées que sur 39 patients. Ainsi, si cette technique semble proposer un moyen simple, rapide et reproductible pour évaluer la fibrose hépatique de manière non invasive, il reste toutefois un réel manque de publications cliniques afin de l'envisager en routine clinique.

c. Strain imaging

L'imagerie de *strain*, ou imagerie de déformation, se base sur la mesure globale ou régionale de la déformation d'un tissu. Initialement utilisée en cardiologie, cette technique permet d'analyser les mouvements effectués par le myocarde en systole et en diastole, et d'identifier d'éventuelles anomalies, comme une région infarctée par exemple (Sitia, 2010). Le *strain* est un paramètre sans unité représentant la déformation d'un objet par rapport à sa forme originelle. En échographie cette technique est utilisable en post-traitement informatisé d'images bidimensionnelles en niveaux de gris standard. L'outil informatique analyse alors l'image et identifie des *speckles*, des marqueurs acoustiques naturels présents sur les images 2D en niveaux de gris. Le suivi du déplacement de ces *speckles* au cours du cycle de contraction myocardique permet d'en analyser la déformation. Un tissu myocardique sain aura une meilleure contractilité, se déformera plus au cours du cycle systole / diastole, et aura ainsi une valeur de *strain* plus importante. Il est possible de calculer et imager le *strain* par segment de myocarde et ainsi de localiser une lésion.

Malgré l'absence de mouvement naturel du foie, cette technique a tout de même pu être transposée à l'étude des stéatohépatopathies. En effet, le foie étant accolé au cœur, la contraction cardiaque permet la transmission d'une onde mécanique dans le foie, lui imposant de faibles déformations. Ces déformations, même faibles, permettent de calculer une valeur de *strain* hépatique. En cas de fibrose hépatique le foie devient plus rigide et moins sensible aux déformations provoquées par les contractions cardiaques. Le *strain* est ainsi diminué proportionnellement à l'avancement de la fibrose (Hotta *et al.*, 2007). L'avantage principal de cette méthode est sa facilité d'accès. En effet l'imagerie de *strain* repose sur l'analyse, en post-traitement, d'images 2D en niveaux de gris, d'échographie classique. Ainsi le seul matériel nécessaire est un échographe standard, largement disponible en pratique clinique courante et un logiciel permettant de réaliser des études de *strain*. Il est alors possible de reconstituer une carte colorée représentant les niveaux de fibrose, de manière similaire à celle obtenue par SWI (Figure 55).

En résumé, les technologies ultrasonores présentent de nombreux atouts pour une utilisation comme outils diagnostiques des NAFLD. Le niveau de stéatose hépatique peut être facilement évalué en imagerie bidimensionnelle classique, par des procédures mettant en œuvre des dispositifs peu coûteux et largement disponibles en pratique clinique. Le diagnostic de la fibrose, *via* les techniques d'élastographie ou de *strain*, nécessite un matériel plus spécifique mais reste relativement simple d'accès. Toutefois ces techniques peuvent manquer de sensibilité et être sujettes à la subjectivité des expérimentateurs. Leurs avantages en font ainsi de bonnes techniques de première ligne, pour un dépistage préliminaire, mais leur inconvénient majeur est qu'elles ne permettent pas une description précise du stade de la pathologie.

5. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)

En plus de proposer des images anatomiques de grande qualité, la technologie d'IRM a permis la mise au point de différentes approches d'imageries quantitatives et fonctionnelles permettant de caractériser au mieux les tissus d'intérêt. La technologie d'IRM propose plusieurs angles d'approche pour l'étude des NAFLD de manière non invasive.

a. Imagerie de la stéatose hépatique

Chemical shift imaging

La technique dite du *chemical shift imaging* (CSI) consiste en l'utilisation de la différence de fréquence de résonance des signaux provenant de différentes sources. Elle est exprimée en partie par million, ou ppm. Ainsi il est possible d'identifier un signal provenant plutôt de l'eau (4,7 ppm), d'un signal provenant plutôt de tissu gras (1,3 ppm) (Figure 54) (Cassidy *et al.*, 2009).

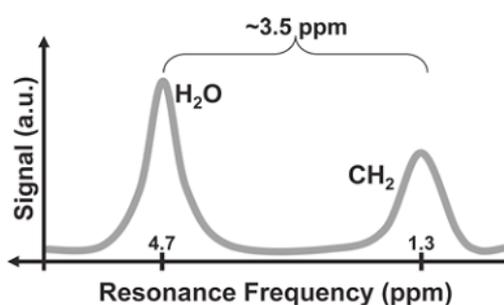


Figure 54 : Spectre de résonance d'un mélange matière grasse / eau. L'axe des abscisses représente le *chemical shift* alors que l'axe des ordonnées représente l'intensité du signal en unité arbitraire. Le *chemical shift* du signal du proton de l'eau est approximativement 3,5 ppm plus élevé que celui de la matière grasse (Cassidy *et al.*, 2009).

La mesure de la PDFF (Proton Density Fat Fraction) a alors été élaborée en se basant sur ce principe. La PDFF est calculée comme la fraction de protons liés au tissu gras sur le nombre total de protons, et représente ainsi le contenu lipidique du foie en pourcentage. Cette mesure peut être représentée sous forme de carte colorée pour une évaluation visuelle rapide de la stéatose hépatique (Figure 55) (Hu and Kan, 2013).

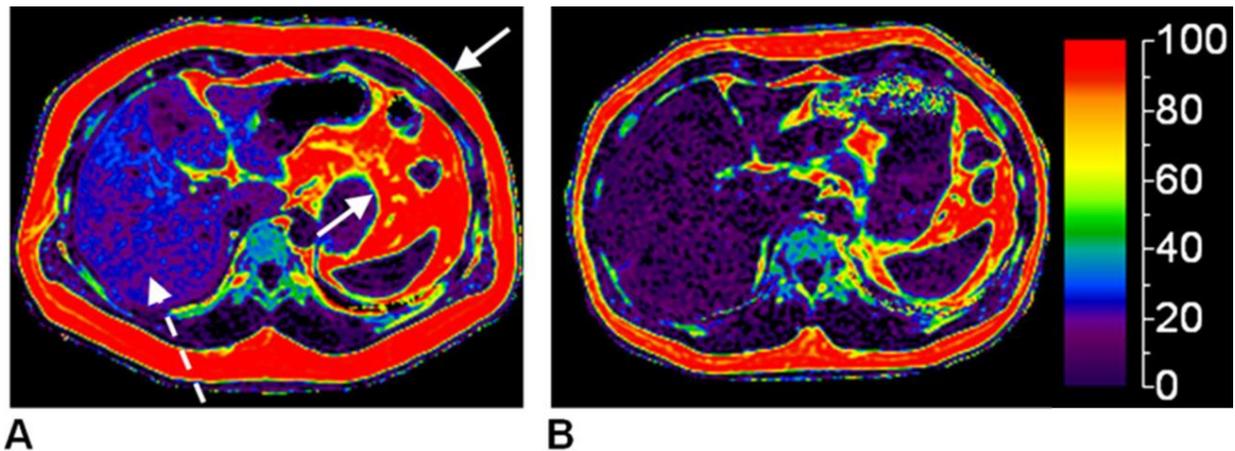


Figure 55 : Images en échelle de couleurs de la PDFF (Proton Density Fat Fraction). Patient adulte mâle, 43 ans, avant (A) et après une période de régime d'exercice physique de 10 mois (B). Flèche pleine : graisse viscérale. Flèche pointillée : stéatose hépatique 22 % en A, 6 % en B (Hu and Kan, 2013).

Cette technique permet de quantifier de manière non invasive la stéatose hépatique. Une étude rétrospective a montré une bonne corrélation de ces résultats de biopsie hépatique ($r=0,82$), et une bonne capacité à discriminer les stades les plus avancés de stéatose des stades les moins avancés (AUROC = 0,95) (Idilman *et al.*, 2013).

Frequency Selective imaging

Contrairement au CSI, où l'eau et le gras sont excités de la même façon afin d'obtenir un seul signal final, la technique du *Frequency Selective Imaging* (FSI) permet de stimuler uniquement un type de tissu. L'émission d'une fréquence radio spécifique précédant l'acquisition des données de résonance permet d'exciter ou de supprimer le signal du gras ou de l'eau. Ainsi il est possible d'obtenir une image mettant en avant le signal du tissu grasseux ou au contraire une image mettant en avant le signal du tissu aqueux (Figure 56) (Hu and Kan, 2013). Cette méthodologie peut être utilisée conjointement avec le CSI afin d'en améliorer les performances et de mieux séparer et identifier les signaux provenant du tissu adipeux.

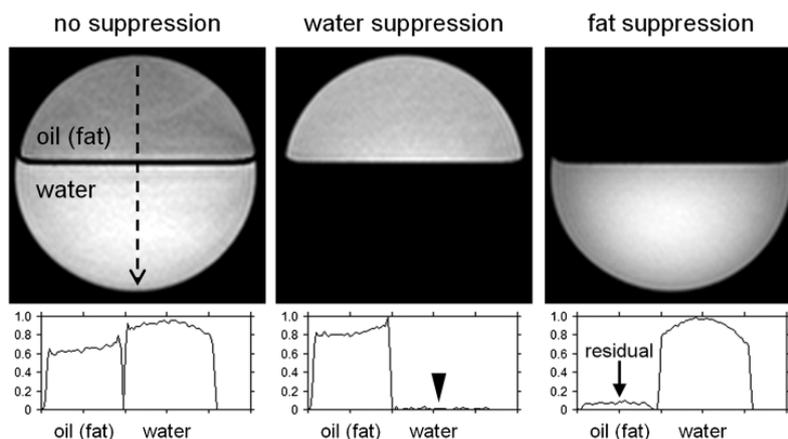


Figure 56 : Démonstration de la FSI (Frequency Selective Imaging) en imagerie à résonance magnétique dans une solution biphasique huile – eau. A : pas de suppression de radiofréquences. B : suppression du spectre de résonance de l'eau. C : suppression du spectre de résonance de l'huile (Hu and Kan, 2013).

Spectroscopie à résonance magnétique

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire ou spectroscopie RMN permet de mesurer directement la composition chimique d'un tissu en fonction de la composition des fréquences des signaux provenant d'un voxel d'intérêt. Cette technique est ainsi extrêmement sensible, permettant de détecter jusqu'à 0,5% de matière grasse dans un tissu d'intérêt. Toutefois, contrairement aux techniques précédentes, la spectroscopie RMN n'apporte aucune information anatomique et s'intéresse à un voxel à la fois. Il est cependant possible d'étendre l'analyse à un ensemble de voxels et de coupler la spectroscopie à de l'imagerie, mais ces protocoles deviennent alors extrêmement longs et fastidieux, impossibles à réaliser en routine clinique.

b. Imagerie de la fibrose

Strain-encoded MRI

Le principe de l'imagerie de *strain*, utilisé en échographie, comme précédemment évoqué, a été adapté à la technologie d'IRM. En l'absence des marqueurs acoustiques utilisés en échographie de *strain*, le *Strain-encoded MRI* fait appel à des marqueurs de résonance magnétique spécifiques, ou *MR tags*. Ces *tags* ont été mis au point pour l'étude de la contractilité myocardique, et sont créés en perturbant la magnétisation du tissu par des modulations de radiofréquences spécifiques (Zerhouni *et al.*, 1988). Ces perturbations vont produire des bandes sombres produisant un quadrillage permettant de visualiser et de mesurer la déformation du tissu. Cette technique permet de différencier un foie sain, se déformant bien en réponse aux mouvements du cœur, d'un foie fibrosé, moins flexible (Figure 57) (Harouni *et al.*, 2014).

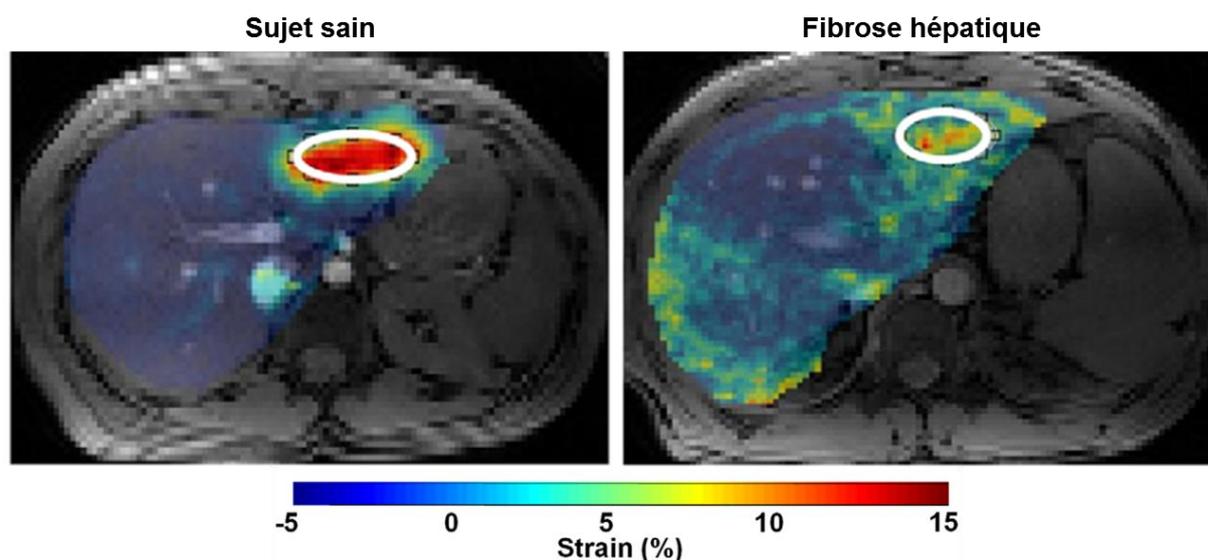


Figure 57 : *Strain encoded MRI*. L'image anatomique obtenue en imagerie par résonance magnétique est superposée avec une carte en échelle de couleurs représentant le *strain* hépatique pour un patient sain à gauche et un patient présentant une fibrose hépatique à droite. L'ellipse blanche est la zone de mesure dessinée automatiquement par le logiciel de traitement et correspond à la zone la plus en contact avec l'apex du cœur (Harouni *et al.*, 2014).

Comme pour la méthode de *strain* en imagerie ultrasonore cette technique a l'avantage d'être entièrement basée sur un post-traitement d'images obtenues selon un protocole standard. Ainsi elle peut être facilement implémentée aux machines et procédures déjà utilisées en routine clinique.

Élastographie par résonance magnétique

Là encore, comme pour l'imagerie de *strain*, l'élastographie, initialement développée pour les ultrasons, a été adaptée à l'IRM. L'élastographie en résonance magnétique reprend ainsi le même principe, décrit ci-dessus pour les ultrasons. Un vibreur externe permet de générer une onde mécanique se propageant à travers les tissus, l'analyse de la propagation de cette onde permet de conclure quant à la composition du tissu cible. Les résultats obtenus avec cette technique permettent de définir le niveau de fibrose hépatique avec une excellente sensibilité et reproductibilité, encore meilleures qu'avec le Fibroscan (Huwart *et al.*, 2007).

c. Résumé

Pour résumer, les techniques se basant sur la résonance magnétique, par leur grande polyvalence, ont montré leur utilité dans le diagnostic des NAFLD. Les techniques d'IRM ont montré des atouts non négligeables dans l'évaluation de la stéatose hépatique, allant même jusqu'à permettre d'identifier la composition en acides gras de foies stéatosés (Leporq *et al.*, 2016). Par ailleurs, les techniques d'élastographie et de *strain* permettent l'évaluation de la fibrose hépatique. Toutefois, si ces outils sont utilisables en recherche beaucoup en sont encore à leurs balbutiements ou restent trop complexes et/ou coûteux à mettre en place en pratique clinique courante. Aujourd'hui les techniques les plus prometteuses pour une utilisation clinique semblent ainsi être le MRI-PDFF pour l'évaluation de la stéatose hépatique et l'élastographie IRM pour l'évaluation de la fibrose. Ces techniques ont déjà clairement montré leurs atouts dans différents essais cliniques (pour revue voir (Dulai *et al.*, 2016)).

6. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est une technique d'imagerie fonctionnelle reposant sur l'injection de radiotraceurs spécifiques d'une cible ou d'une fonction. De par la diversité des traceurs utilisables cette modalité d'imagerie est présente dans de nombreux domaines médicaux, que ce soit en recherche ou en pratique clinique courante. Toutefois elle reste relativement peu représentée dans les études s'intéressant au spectre des NAFLD. Il est toutefois possible de citer certains outils intéressants.

a. Xenon-133

Le Xenon-133 (^{133}Xe , R_γ : 81 keV, R_β : 340 keV, $T_{1/2}$: 5,3 jours) est un gaz très soluble dans les tissus gras, il est utilisé en pratique clinique courante pour l'évaluation de la perfusion cérébrale et pulmonaire par exemple. De par ses propriétés liposolubles, sa capacité à marquer la stéatose chez des patients atteints de NAFLD a ainsi été testée dans une étude sur 258 patients (Al-Busafi *et al.*, 2012). La scintigraphie au ^{133}Xe a permis de diagnostiquer la stéatose hépatique avec une sensibilité de 94,3% et une spécificité de 87,5%, les résultats corrélant fortement avec ceux de la biopsie hépatique ($r = 0,87$, $p < 0,001$). Ces résultats se sont avérés également meilleurs que ceux obtenus en échographie, avec une sensibilité et une spécificité de seulement 62,9% et 75% respectivement. Cette méthode s'est donc avérée efficace pour évaluer la stéatose de manière non invasive mais ne permet pas d'obtenir plus d'informations sur le stade d'évolution des NAFLD. De plus, même si les dangers d'expositions sont minimes, la période radioactive du ^{133}Xe est tout de même de 5,25 jours, ce qui n'est pas négligeable. Malgré les résultats encourageants obtenus avec le ^{133}Xe , il semblerait que les inconvénients liés à sa période, ainsi que le développement des diverses autres techniques de détection de la stéatose, n'aient pas incité les équipes de recherche à se pencher plus amplement sur le potentiel du ^{133}Xe dans l'évaluation des NAFLD.

b. Imagerie des macrophages

Les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, jouent un rôle prépondérant dans la pathogenèse de la NASH et particulièrement dans le développement de l'inflammation, fondamental dans l'évolution de la maladie (voir partie inflammation). Il a été montré que lors du développement de la NASH, les cellules de Kupffer avaient une activité de production de cytokines exacerbée mais une activité phagocytaire diminuée (McCuskey *et al.*, 2004). Partant de cette constatation, Kikuchi *et al.* ont cherché à évaluer l'activité phagocytaire, et donc indirectement le stade inflammatoire de la NASH, par l'étude de la captation de colloïdes de ^{99m}Tc -phytate, phagocytés, chez des patients NAFLD (Kikuchi *et al.*, 2009). En quantifiant la captation du traceur dans différents organes, ils ont pu montrer que le rapport d'activités foie/rate était significativement diminué chez les

patients NASH par rapport aux patients ayant des stéatoses simples. Ce ratio a également permis de discriminer plus finement les patients atteints de stéatose simple des patients avec une NASH précoce. Avec pour standard la biopsie hépatique, le ratio de captation du traceur foie/rate permet de diagnostiquer la NASH avec une spécificité de 75% et une sensibilité de 99,9% (Kikuchi *et al.*, 2009). L'utilisation de ce traceur a montré de bons résultats pour évaluer la progression de la NAFLD et identifier une stéatose simple d'une NASH. La possibilité de quantifier la captation du traceur et de calculer un ratio foie/rate, avec une valeur numérique, permet l'obtention d'un résultat objectif, comparable d'une étude à l'autre. Toutefois il ne semble pas y avoir eu de suite à cette étude depuis sa publication en 2009.

En 2016, Zheng *et al.* s'intéressent eux aussi aux cellules de Kupffer dans la NASH en étudiant deux fragments d'anticorps, des nanobodies, dirigés contre Vsig4 (V-set and Ig domain containing 4) et Clec4F (C-type lectin domain family 4, member F) (Zheng *et al.*, 2016). Si Clec4F, appelé également KCR (Kupffer Cell Receptor) est un marqueur spécifique des cellules de Kupffer murines, Vsig4 est spécifique d'une population de macrophages résidents à la fois dans le foie mais aussi dans le cœur, le poumon, les surrénales et la cavité péritonéale. La captation des traceurs a été évaluée dans deux modèles murins distincts connus pour faire varier le nombre de cellules de Kupffer. Dans un modèle d'hépatite auto-immune induite par injection unique de Concanavalin A, la quantité de cellules de Kupffer chute rapidement. Cette étude a montré une diminution de la captation des nanobodies anti Vsig4 et Clec4F à 12h et 24h post injection, avec un retour à la normale à 72h (Zheng *et al.*, 2016). Au contraire, dans un modèle de NASH induite par un régime MCD la captation des traceurs est augmentée après 4 semaines de régime.

Ces données ont montré que ces nanobodies étaient capables de suivre la dynamique des cellules de Kupffer au sein du foie pathologique et pouvaient ainsi être utilisés dans l'évaluation des pathologies inflammatoires hépatiques. Mais ces études ont également démontré une excellente colocalisation de la captation des traceurs anti-Vsig4, spécifiques aux cellules de Kupffer, murines uniquement, et

de Clec4F, spécifiques de sous-populations d'une plus grande variété de macrophages, mais retrouvables chez l'homme. Ces études font ainsi la démonstration de l'efficacité de l'imagerie des cellules de Kupffer *via* le ciblage de Vsig4, au même titre que celui de Clec4, par des nanobodies radiomarqués. Par conséquent elles proposent à la fois un outil de recherche préclinique intéressant mais également un nouveau radiotracer candidat à un transfert en clinique. Cependant ce travail n'en est qu'à ces débuts, et la pertinence du suivi de la dynamique des cellules de Kupffer reste à être évaluée afin de connaître sa capacité à évaluer le stade d'avancement des NAFLD.

c. ^{99m}Tc-MIBI

Le Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (^{99m}Tc-MIBI) est un marqueur de la perfusion myocardique très largement utilisé en routine clinique, en imagerie SPECT, afin de diagnostiquer les défauts de perfusion myocardique. Le MIBI est un cation lipophile, sa captation reflète la fonction mitochondriale du tissu, il est capté et retenu par les mitochondries grâce à leur potentiel de membrane électronégatif (Chiu *et al.*, 1990). Des anomalies mitochondriales ayant été mises en évidence au cours de la pathogenèse de la NASH (Feldstein, Canbay, Angulo, *et al.*, 2003), Masuda *et al.* se sont intéressés à la captation du MIBI dans le foie de patients atteints de NAFLD (Masuda *et al.*, 2012). Dans cette étude, 26 patients, confirmés par biopsies, ont été répartis en 3 groupes selon les critères histologiques habituels : non NASH, NASH précoce et NASH affirmée (Kleiner *et al.*, 2005). Les captations hépatique et myocardique du MIBI ont été quantifiées après une scintigraphie au repos. Les captations myocardiques de MIBI se sont révélées significativement plus faibles chez les patients NASH que chez les patients présentant une stéatose simple. De plus, le ratio de captation foie/cœur du MIBI s'est avéré significativement corrélé avec les scores de NAFLD établis par histologie. Ainsi cette étude a montré qu'il était possible de discriminer des patients selon le stade de développement de leur NAFLD de manière non invasive par imagerie SPECT avec le ^{99m}Tc-MIBI.

Par la suite, Rokugawa *et al.* ont confirmé le potentiel du MIBI pour suivre l'évolution des NAFLD, mais cette fois dans un modèle de NASH murine induite par un régime MCD. En réalisant des scintigraphies après l'injection de MIBI à

plusieurs temps après le début du régime, parallèlement à des scoring histologiques de l'évolution des NAFLD, l'équipe a pu montrer une diminution de la captation du MIBI inversement corrélée avec l'augmentation du score de NAFLD (Rokugawa *et al.*, 2014).

d. Résumé

Comme les précédentes modalités d'imagerie décrites, la scintigraphie se veut polyvalente. Potentiellement, elle permet de s'intéresser à autant de cibles, de fonctions, qu'il peut exister de traceurs. Si elle est aujourd'hui moins installée que les autres modalités pour l'exploration des NAFLD, il est à parier que les nombreuses avancées technologiques et l'engouement actuelle pour l'imagerie moléculaire permettra le développement de traceurs prometteurs pour cette indication.

7. Autres

Les VOCs

Des techniques faisant appel à des approches plus originales font également leur apparition. Parmi celles-ci, il est possible de citer par exemple l'analyse des composés volatiles organiques dans l'air expiré (Volatile Organic Compounds, VOCs). Grâce à des techniques d'analyse très sensibles comme la chromatographie gazeuse, liquide ou la spectrométrie de masse, des molécules d'intérêt sont détectées dans l'air expiré (Mashir and Dweik, 2009). Cette technique innovante a récemment fait son apparition comme nouvelle alternative de diagnostic dans le cadre par exemple de rejet de transplantation cardiaque, d'infection à *Helicobacter pylori*, ou d'intoxication au monoxyde de carbone (Paschke *et al.*, 2010). Toutefois l'application la plus connue reste bien sûr la détection de la consommation d'alcool. Une étude a montré qu'avec seulement 3 VOCs (n-tridecane, 3-methylbutanonitrile et le 1-propanol), marqueurs de la présence d'espèces réactives de l'oxygène issues de la peroxydation des acides gras insaturés, il était possible de discriminer des patients avec ou sans NASH avec un taux d'erreur moins important qu'avec les biomarqueurs sanguins classiques (Verdam *et al.*, 2013). Étant donné la simplicité de l'examen pour le patient et l'absence de contraintes ou d'effets secondaires l'analyse des VOCs semble extrêmement intéressante. Si la

littérature reste faible pour cette application, la société Exalenz Bioscience, spécialisée dans le diagnostic de l'infection au *H. pylori* grâce aux VOCs, a lancé en 2015 un essai clinique rassemblant 200 personnes aux États-Unis et en Europe afin de valider cette nouvelle méthode de diagnostic.

Les microparticules

Les microparticules comme biomarqueurs sanguins permettent de s'intéresser à certaines modifications tissulaires à distance. Ces microparticules, des petites vésicules extracellulaires sont larguées dans le milieu extracellulaire par des cellules activées ou mourantes. Elles sont des médiateurs importants dans la signalisation intercellulaire et portent ainsi la signature de leur cellule d'origine via des récepteurs de surface, des protéines spécifiques et même des ARN. La communication intercellulaire permise par ces vésicules ne s'arrêtant pas au sein d'un seul tissu, elles peuvent être envoyées vers d'autres cibles via la circulation sanguine. Ces microparticules ont récemment été étudiées dans divers pathologies telles que la malaria ou l'insuffisance rénale (Amabile *et al.*, 2012; Mfonkeu *et al.*, 2010). Leur disponibilité dans le sang et leur signature spécifique a rendu leur étude possible sur des cohortes de patients, et ainsi il a été possible de dresser des profils d'expression de ces microparticules dans le cadre de pathologies comme les NAFLD ou l'hépatite C (Kornek *et al.*, 2012). Une augmentation des niveaux sanguins de microparticules provenant de monocytes CD14+ et de *natural killers* invariants a été montrée chez des patients atteints de NAFLD. Cette augmentation corrèle même avec le degré de sévérité histologique de la NASH (Kornek *et al.*, 2012). Ce nouveau genre de biomarqueur semble alors prometteur et le suivi temporel des concentrations sanguines des microparticules pourrait permettre d'identifier le stade de développement des NAFLD de manière non invasive. Toutefois si différentes publications se sont intéressées aux microparticules, il ne semble pas aujourd'hui y avoir de plus amples études cliniques sur ce mode de diagnostic.

8. Conclusion

En résumé, les modalités de diagnostic et d'imagerie des NAFLD sont nombreuses, et l'intérêt grandissant porté à ces pathologies stimule les recherches dans les différents domaines. Chaque modalité apporte des avantages et des inconvénients sur différents critères. Toutefois il reste une caractéristique relativement peu exploitée pour la caractérisation de l'évolution des NAFLD, l'inflammation, point clé de l'évolution entre stéatose simple et NASH. Les caractéristiques des différentes modalités sont résumées dans le tableau 8 (Tovo *et al.*, 2015).

Tableau 8 : caractéristiques des différentes méthodes d'évaluation des NAFLD(Tovo *et al.*, 2015)

Imaging method	Accuracy			Risk	Cost
	Steatosis	NASH	Fibrosis		
US	++	0	0	0	+
CT	++	0	0	+++	++
MRI	+++	0	0	++	+++
TE	++	0	++	0	++
ARFI	++	0	++	0	++
MRE	++	+	+++	++	+++
Scintigraphy	++	++	0	+	+

ARFI: Acoustic radiation force impulse; CT: Computed tomography; MRE: Magnetic resonance-based elastography; MRI: Magnetic resonance imaging; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis; TE: Transient elastography; US: Ultrasound; 0: Absent; +: Low; ++: Intermediate; +++: High.

5) Traitements

À l'heure actuelle il n'y a aucun véritable traitement spécifique de la NASH, toutefois différents types de thérapeutiques spécifiques sont à l'étude. Par ailleurs, il existe des moyens d'interventions préventifs à l'évolution de la maladie. Les évolutions possibles des NAFLD, à partir de l'apparition de fibrose avancée, étant irréversibles, il est primordial de mettre au point des traitements efficaces pouvant prévenir ces évolutions, voire les inverser.

1. Mesures hygiéno-diététiques

Comme les NAFLD sont étroitement liées à l'obésité, et à l'insulinorésistance, les premières mesures recommandées seront similaires à celles préconisées pour le syndrome métabolique. Une modification du style de vie incluant une alimentation saine et équilibrée et une activité physique régulière seront donc bénéfiques. Des études ont en effet montré les effets bénéfiques d'une réduction de l'apport calorique associée à une activité physique modérée. L'accompagnement de 30 patients atteints de NASH, pour la gestion de l'activité sportive et des repas, a permis d'atteindre en moins d'un an une perte de poids de 7 à 10% accompagnée d'une amélioration des paramètres biochimiques et histologiques (Promrat *et al.*, 2010). Indépendamment d'un régime alimentaire sain, l'exercice physique seul apporte des améliorations. De plus, l'intensité de l'activité physique est proportionnelle aux bénéfices obtenus (Kistler *et al.*, 2011). Dans tous les cas, le fait de surveiller son alimentation et de pratiquer une activité physique est bénéfique, autant pour les atteintes hépatiques des NAFLD que pour les complications fréquemment associées (diabète, risques cardiovasculaires par exemple). Toutefois ces modifications du style de vie nécessitent une discipline stricte pour être bénéfiques, de plus si elles fonctionnent bien pour des stades plutôt précoces à modérés de la pathologie, il est probable qu'elles ne soient pas suffisantes ou même impossibles à appliquer pour des stades plus avancés. Ainsi il reste nécessaire de développer des thérapeutiques permettant de traiter au mieux les NAFLD et ses formes plus avancées.

2. Agonistes des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)

L'activation des PPAR par des agonistes a beaucoup été étudiée dans le cadre du syndrome métabolique (page 55). De par ses nombreux effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline et les métabolismes glucidique et lipidique, l'activation des PPAR présente un intérêt pour l'amélioration des NAFLD (Figure 58) (Blaschke, 2006).

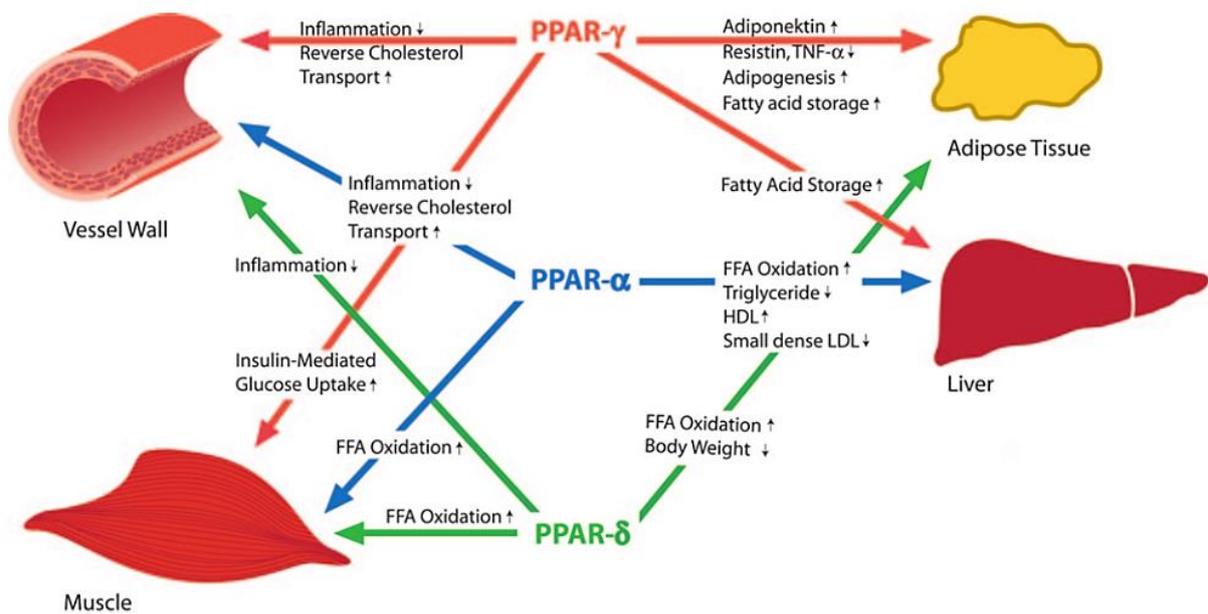


Figure 58 : Effets induits par l'activation des différents isoformes de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) sur le tissu adipeux, le foie, le muscle et la paroi vasculaire (Blaschke, 2006). L'activation des différentes isoformes a des effets anti-inflammatoires et permet d'améliorer les métabolismes glucidique et lipidique. Le stockage des lipides est augmenté dans le tissu adipeux et leur β -oxydation est augmentée dans le muscle et le foie. Le transport insulinosensible du glucose est augmenté dans le muscle.

Les thiazolidinediones, ou glitazones, sont des molécules activatrices des PPAR γ . Au vu de leurs effets bénéfiques prouvés sur l'homéostasie glucidique et lipidique, avec des effets insulinosensibilisateurs, ces molécules ont été testées pour le traitement de la NASH. Parmi celles-ci on retiendra la Rosiglitazone et la Pioglitazone qui ont sans doute été les plus étudiées. La pioglitazone notamment a fait l'objet d'un essai clinique en 2010, regroupant 247 patients atteints de NAFLD traités pendant 96 semaines. Cette étude a été nommée PIVENS, pour "Pioglitazone, Vitamin E, or placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis" (Sanyal *et al.*, 2010). Si les résultats ont été mitigés pour l'amélioration globale des NAFLD,

la pioglitazone a toutefois permis d'améliorer certains paramètres importants tels que la stéatose, l'inflammation lobulaire et le ballonnement hépatocellulaire. Les effets de la pioglitazone ont également été évalués sur un modèle murin de NASH induite par un régime MCD (page 109). Il a ainsi été montré que la pioglitazone diminue le profil inflammatoire et les dommages hépatiques induits par le régime MCD (Kawai *et al.*, 2012).

Parmi les concurrents actuels à l'élaboration d'un agent thérapeutique approuvé pour le traitement de la NASH, on retrouve un activateur des PPAR δ et PPAR α . Il s'agit de l'acide 2-(2,6-diméthyl-4-{3-[4-(méthylsulfanyl)phényl]-3-oxoprop-1-én-1-yl}phénoxy)-2-méthylpropanoïque ou GFT505 ou Elafibranor. Le GFT505 est développé par une société française, Genfit. Des études précliniques ont montré des résultats très prometteurs, notamment sur des modèles de souris nourries avec un régime MCD (Staels *et al.*, 2013). Le GFT505 a montré des diminutions dose dépendantes des biomarqueurs, triglycérides et cholestérol hépatiques, liées à des améliorations des paramètres histologiques. Dans la même étude, mais sur un modèle de rats développant une fibrose hépatique importante, causée par des injections de ligand à la chimiokine 4 (CCL4), l'administration de GFT505 a permis la régression de la fibrose hépatique au niveau des animaux contrôles. Surtout, il a été montré que les effets bénéfiques de la molécule sur l'homéostasie glucidique et lipidique n'étaient pas accompagnés des effets cardiovasculaires délétères, observés usuellement avec les autres traitements agissant sur les PPARs (Hanf *et al.*, 2014).

En clinique, le GFT505 a également confirmé son potentiel anti diabétique et insulinosensibilisateur dans différentes études avec des patients obèses et insulino-résistants (Cariou *et al.*, 2011, 2013). Dans une étude de phase IIb, sur une cohorte de 274 patients traités pendant un an, dans 56 centres dans le monde, Elafibranor a récemment montré des résultats encourageants mais peu reproductibles (Ratziu *et al.*, 2016). Le traitement a permis d'améliorer le score histologique de 2 points sur tous les paramètres. Toutefois ces modifications n'étaient pas suffisantes d'un point de vue statistique. En effet, si les résultats étaient très satisfaisants chez les patients ayant répondu au traitement, un grand

nombre de patients n'ont absolument pas répondu à celui-ci. Les auteurs expliquent ce problème par un choix de patients présentant un stade de NASH trop peu avancé et une pharmacologie à améliorer. Quoiqu'il en soit, les bénéfices sont indéniables chez les patients ayant répondu au traitement et une phase III de grande envergure a été lancée fin 2015. Cette fois, des patients présentant une NASH plus sévère seront inclus, avec un effectif estimé de 2000. L'objectif à atteindre après 72 jours de traitement sera la réversion des critères histologiques de ballonnement et d'inflammation à un score de 0, sans aggravation de la fibrose. La stéatose ne rentre pas dans les critères d'étude.

3. Agonistes des FXR (*Farnesoid X Receptor*)

L'un des axes thérapeutiques prometteurs dans l'indication de la NASH est l'activation du récepteur FXR. Il s'agit d'un récepteur de la superfamille des récepteurs nucléaires, exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et plus faiblement dans le tissu adipeux. Il tire son nom du farnésol, une substance présente dans les huiles essentielles et qui a permis d'activer ces récepteurs pour la première fois. Toutefois les ligands physiologiques de FXR sont les acides biliaires, agents détergents permettant de solubiliser les acides gras dans l'intestin pour favoriser leur absorption. L'activation de FXR varie selon l'acide biliaire mis en jeu (Makishima *et al.*, 1999), de l'acide chénodésoxycholique (CDCA), le plus efficace, à l'acide ursodésoxycholique (UDCA) qui est totalement inactif. En sa qualité de récepteur nucléaire, FXR régule l'activité de nombreux gènes impliqués dans la régulation du métabolisme biliaire, mais aussi de nombreux gènes impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique (Figure 59) (Adorini *et al.*, 2012).

Les voies de signalisation mises en jeu par l'activation de FXR sont nombreuses, mais elles semblent toutes bénéfiques pour la gestion des désordres métaboliques (Cariou and Staels, 2007; Modica *et al.*, 2010). Elles vont par exemple diminuer la lipogenèse en inhibant SREBP1-c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1-c), lui-même activateur de l'acide gras synthase (ou fatty acid synthase, FAS) et de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'activation de FXR permet aussi d'augmenter l'élimination hépatique des acides gras en augmentant la β -oxydation *via* la stimulation de PPAR α . Par ailleurs, FXR va également agir sur le métabolisme glucidique en diminuant la néoglucogénèse et en augmentant la synthèse de glycogène. Pour résumer, l'activation de FXR va globalement avoir un effet insulinosensibilisateur qui va permettre de diminuer la stéatose hépatique et améliorer les désordres métaboliques. L'activation de FXR semble être une excellente approche pour le traitement du syndrome métabolique ainsi qu'à l'amélioration des NAFLD.

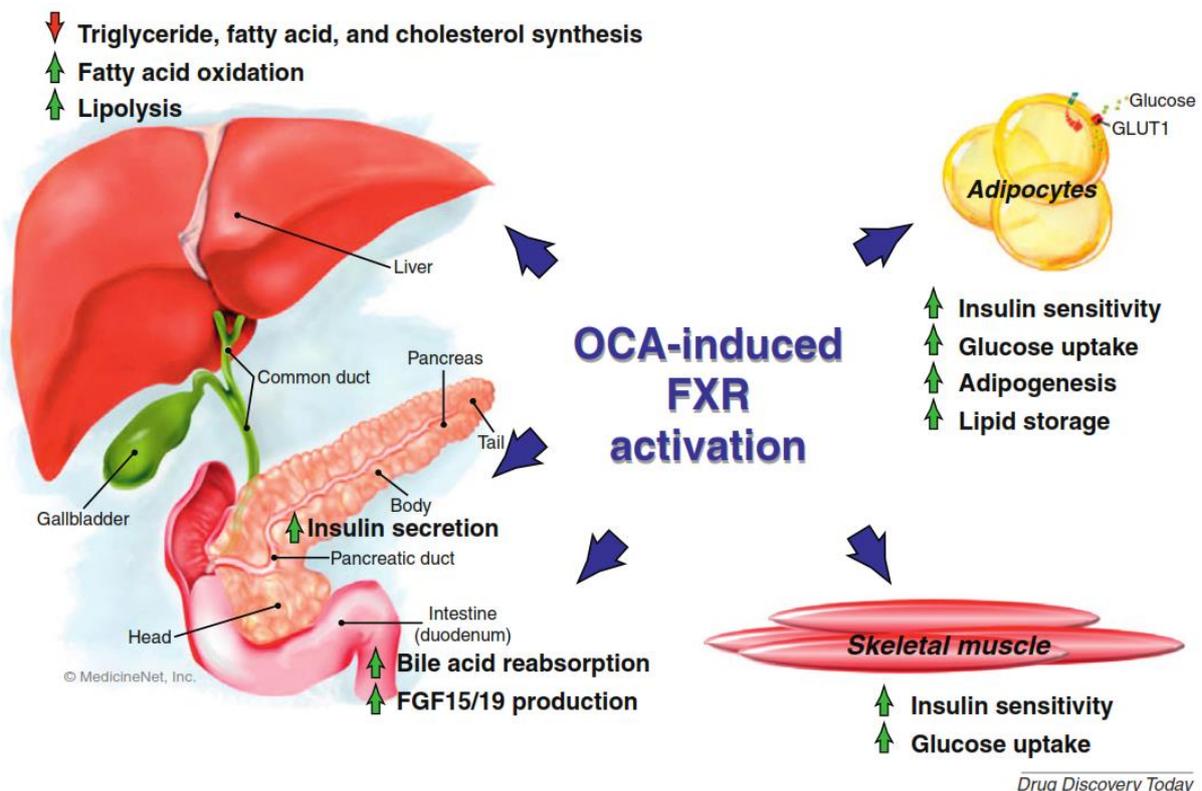


Figure 59 : Effets d'agonistes de FXR (Farnesoïd X Receptor) tels que l'acide obéticholique (OCA) sur les métabolismes lipidique et glucidique (Adorini *et al.*, 2012). L'activation de FXR augmente la sécrétion d'insuline par le pancréas et améliore la sensibilité à l'insuline dans le muscle, stimulant le transport du glucose dans ce dernier. La métabolisation des lipides est augmentée dans le foie, de même que leur export et leur stockage vers le tissu adipeux périphérique.

Dans le but de créer de nouveaux agents thérapeutiques activateurs de FXR, sans effet secondaire, des agonistes semi synthétiques et synthétiques ont été mis au point. Des activateurs de FXR ont dès lors été étudiés dans le cadre des cholangites et des pathologies du système biliaire, et compte tenu des effets bénéfiques de ces molécules sur le métabolisme, dans les maladies métaboliques telles que les NAFLD.

GW4064 est un agoniste synthétique, sélectif de FXR, publié pour la première fois en 2000 (Maloney *et al.*, 2000). Un traitement en gavage oral de 7 jours sur des souris hyperlipidémiques a permis de réduire le taux de triglycérides circulants. Plus tard, une autre étude a notamment montré un effet anti inflammatoire au niveau hépatique sur un modèle de souris nourries avec un régime "high fat", riche en lipides (Yao, 2014). Toutefois les résultats des études précliniques n'ont pas été suffisantes pour espérer une progression vers des études cliniques.

WAY-362450 (ou Turofexorate Isopropyl) a été caractérisé en 2009 comme un agoniste sélectif de FXR, avec une bonne biodisponibilité par administration orale (Flatt *et al.*, 2009). Sur des souris développant une stéatose hépatique induite par un régime riche en fructose, WAY-362450 a montré des résultats satisfaisants dans l'amélioration du métabolisme lipidique, mais aussi de l'inflammation hépatique en atténuant l'expression des cytokines inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-6 (Liu *et al.*, 2014). Ce traitement a également montré de bons résultats dans la résolution de la NASH chez des souris nourries avec un régime MCD (Zhang *et al.*, 2009). Quatre semaines de gavage quotidien avec du WAY-362450 ont permis de diminuer drastiquement la plupart des marqueurs de la NASH induites par le régime MCD. Le contenu lipidique hépatique a été peu ou pas impacté par le traitement, toutefois l'inflammation hépatique a été diminuée, avec notamment une baisse de l'expression de VCAM-1, MCP-1 ou encore TIMP1. Différentes études ont montré les effets bénéfiques de WAY-362450 sur la dyslipidémie et le stress oxydant hépatique notamment (Evans *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014).

L'acide obéticholique (OCA, acide 6-éthylchénodésoxycholique ou encore INT-747) est un dérivé semi synthétique de l'acide biliaire primaire humain chénodésoxycholique, développé par la société américaine, Intercept Pharma. Aujourd'hui il fait sans doute partie des molécules thérapeutiques les plus prometteuses et surtout les plus avancées dans leurs études cliniques. L'OCA est un agoniste sélectif de FXR permettant une activation plus élevée que celle obtenue avec l'acide biliaire naturelle le plus efficace, le CDCA, ou avec un agoniste synthétique comme le GW4064 (Pellicciari *et al.*, 2004). Il a de plus montré des effets anti-cholestatique et hépatoprotecteur (Pellicciari *et al.*, 2002). Plusieurs études précliniques ont alors montré, sur différents modèles cellulaires et animaux, des améliorations de la sensibilité à l'insuline, des métabolismes lipidique et glucidique, mais aussi des effets anti-inflammatoire et anti-fibrotique dans le foie et les reins (Adorini *et al.*, 2012). L'OCA est par la suite devenu le premier agoniste de FXR à entrer dans un essai clinique de phase II sur des cohortes de patients atteints de diabète de type 2 et de NAFLD (Mudaliar *et al.*, 2013). Cette étude a montré qu'après un traitement de 6 semaines, la sensibilité à l'insuline est améliorée et le poids des patients a tendance à diminuer avec la dose d'OCA prescrite. Une étude de plus grande envergure, multicentrique, randomisée et en double aveugle, a alors rapidement suivi. Cette étude appelée FLINT (Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment) a suivi plus de 200 patients pendant 72 semaines de traitement avec des biopsies hépatiques basales et finales comme moyen d'évaluation de la pathologie. Les caractéristiques histologiques de la NASH (stéatose, inflammation, ballonnement hépatocytaire, fibrose) ont été améliorées par le traitement à l'OCA. Toutefois les bénéfices métaboliques précédemment observés n'ont pu être mis en évidence lors de cette étude et l'élévation du taux de cholestérol et de l'insulino résistance, même modeste, a soulevé la question d'un éventuel effet néfaste sur le plan cardiovasculaire. Une phase III, appelée REGENERATE (Randomized Global Phase 3 Study to Evaluate the Impact on NASH With Fibrosis of Obeticholic Acid Treatment), a débuté fin 2015 afin d'étudier l'effet de l'OCA sur des patients atteints de NASH avec une fibrose de stade modéré à avancé. En mai 2016 la FDA a approuvé l'OCA en association à l'UDCA comme traitement pour la cholangite

biliaire primitive. L'OCA semble donc en bonne voie, sauf résultat contraire de la phase III, pour se voir un jour accepté comme agent thérapeutique pour la NASH.

Les NAFLD, par le nombre de cas grandissant, ont beaucoup attiré l'attention des chercheurs ces dernières années. Il existe ainsi un tel nombre d'études, s'intéressant à autant de voies d'action que de thérapeutiques de natures différentes, que finalement peu d'entre elles ont été évoquées ici. Si l'acide obéticholique et le GFT505 ont déjà été évoqués comme agents thérapeutiques prometteuses actuellement en phase clinique, il est possible de retrouver d'autres molécules dans le tableau ci-dessous, dont la plupart n'ont pour autant pas fait leurs preuves chez l'homme (Tableau 9) (Gawrieh and Chalasani, 2015).

Agent	Putative mechanism/s	Effects on NAFLD	Studies in human NAFLD
Obeticholic acid	FXR ligand Improves glucose and lipid metabolism	Improves histology including fibrosis	Yes
Fibroblast growth factor 21	Regulates glucose and lipid metabolism	Improves histology in animal models including fibrosis	None yet
Exenatide and Liraglutide	GLP-1 agonists Regulate glucose metabolism and post-prandial insulin secretion	Improves histology including fibrosis	Yes
Cysteamine	Glutathione precursor Antioxidant	Improves ALT and keratin-18	Yes, ongoing clinical trial
Simtuzumab	LOXL2 antagonist Antifibrotic	Unknown	Yes, ongoing clinical trial
GR-MD-02	Galactin 3 inhibitor	Improves fibrosis in murine models	Yes, ongoing clinical trial
Cenicriviroc	Inhibitor of CCR 2 and 5	Improves hepatic inflammation and fibrosis in murine models	Yes, ongoing clinical trial
Aramchol	Fatty acid–bile acid conjugate Inhibits stearyl coenzyme A desaturase 1	Decreases hepatic fat content	Yes, ongoing clinical trial
GFT505	PPAR- α and δ agonist Improves insulin sensitivity and lipid metabolism	Improves hepatic steatosis, inflammation and fibrosis in murine models	Yes, the scientific results of the GOLDEN 505 trial are awaited

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; CCR, C-C chemokine receptors; FXR, farnesoid X receptor; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GOLDEN 505, A Multicentre, Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of GFT505 Once Daily on Steatohepatitis in Patients With Non-Alcoholic Steatohepatitis; LOX, lysyl oxidase; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; PPAR- α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ .

Tableau 9 : Différents traitements des NAFLD actuellement à l'étude (Gawrieh and Chalasani, 2015).

6) cAbVCAM1-5, traceur de l'inflammation

Dans la seconde partie de ces travaux de thèse, consacrée à l'imagerie de la NASH, un agent d'imagerie initialement développé au laboratoire comme traceur des plaques d'athérome vulnérable, sera étudié comme marqueur potentiel de l'inflammation hépatique dans un modèle murin de NASH. Cet agent d'imagerie, appelé ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, est un nanobody dirigé contre VCAM-1 et marqué au technétium 99 métastable pour une utilisation en imagerie SPECT.

a. L'ingénierie des anticorps

Quelle que soit la modalité d'imagerie, un bon traceur d'imagerie moléculaire doit réunir certains critères. Il doit présenter une bonne affinité pour une cible spécifique, en évitant au maximum une fixation aspécifique dans les autres tissus. Cette cible doit donc être atteinte rapidement, quelle que soit sa localisation. Le traceur doit aussi avoir une pénétration tissulaire satisfaisante. De plus, la clairance sanguine doit être rapide, pour minimiser le bruit de fond. Tous ces critères sont liés principalement aux caractéristiques de la molécule vectrice. Les anticorps monoclonaux ont été beaucoup plébiscités, à la fois pour la thérapie et l'imagerie diagnostique grâce à leur excellente spécificité pour leur cible. Toutefois la grande taille de ces molécules, d'un poids moléculaire proche de 150 kDa, leur confère divers inconvénients pour une utilisation en imagerie, et notamment une clairance sanguine très faible et une mauvaise pénétration tissulaire. Ainsi très peu d'anticorps sont disponibles pour l'imagerie en pratique clinique courante (Olafsen and Wu, 2010).

Un anticorps, ou immunoglobuline G (IgG), est une protéine constituée de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères, reliées entre elles par des ponts disulfures, elles forment un ensemble pesant 150 kDa (Figure 60, Wikimedia Commons).

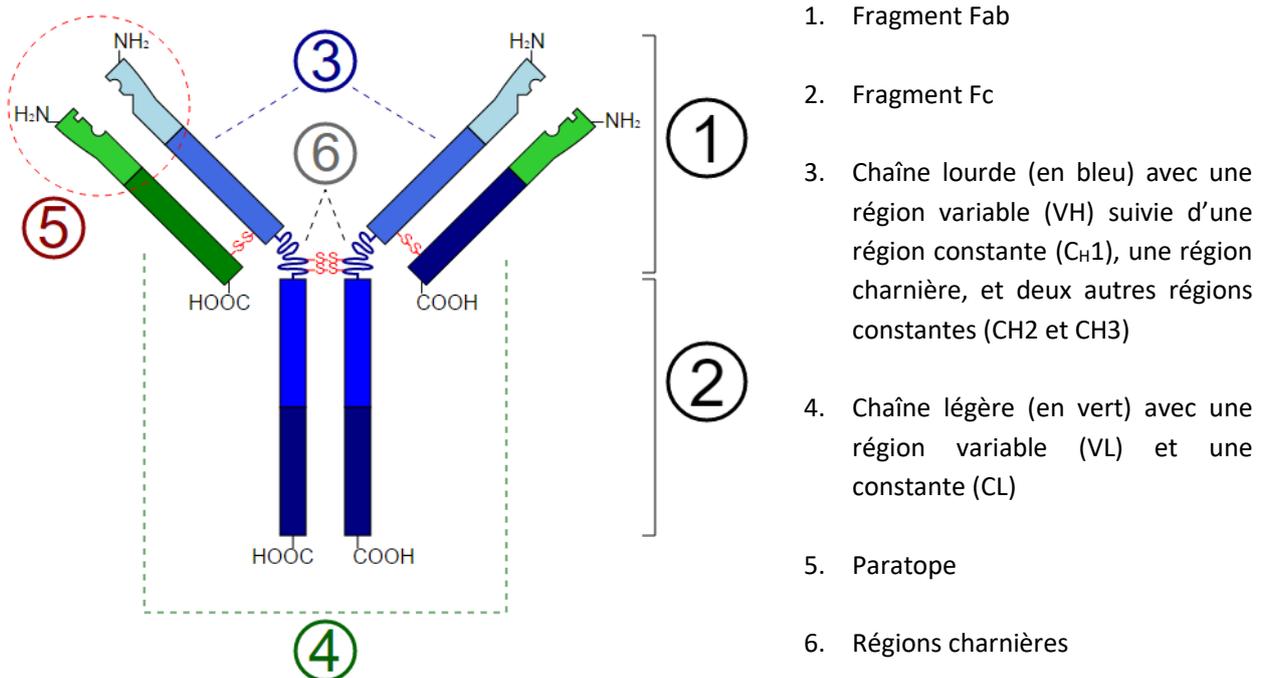


Figure 60 : Structure d'un anticorps classique. Adaptée d'après Wikimedia Commons

L'extrémité des "bras" des chaînes lourdes et légères ont des domaines variables, l'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères constitue le site de reconnaissance de l'antigène, ou paratope. Si le site de reconnaissance est variable et spécifique à chaque antigène reconnu, les domaines constants sont eux hautement conservés d'un anticorps à un autre. Afin d'obtenir des vecteurs proposant des caractéristiques idéales à une utilisation en imagerie, différents variants, fragments d'anticorps "conventionnels" ont été créés et testés (Olafsen and Wu, 2010) (Figure 61). Ces constructions ont permis l'obtention de résultats prometteurs dans de nombreux domaines, certains étant déjà été approuvés pour une utilisation clinique, et beaucoup d'autres étant à des stades d'études cliniques avancés (Holliger and Hudson, 2005).

Les recherches dans le domaine de l'imagerie moléculaire et de la théranostique s'étant beaucoup développées, de nombreuses variantes d'anticorps ont été étudiées, comme les Fab (Fragment Antigen Binding), les scFv (single chain variable fragment), les diabodies ou les minibodies (Figure 62). Tous sont différents par leur taille, mais tous ont conservés la région variable spécifique à l'antigène. Parmi ces différentes constructions, le Fab, formé de la chaîne légère et d'un fragment de la chaîne lourde a la même affinité que l'anticorps entier tout en proposant une taille réduite à seulement 55 kDa. Parmi les fragments d'anticorps autorisés en utilisation clinique le Fab est le plus représenté (Holliger and Hudson, 2005). Il est possible de retrouver des Fab approuvés pour l'imagerie du cancer colorectal (arcitumomab, CEA Scan®), ou pour la thérapie des aneurs instables (abciximab, ReoPro®) par exemple.

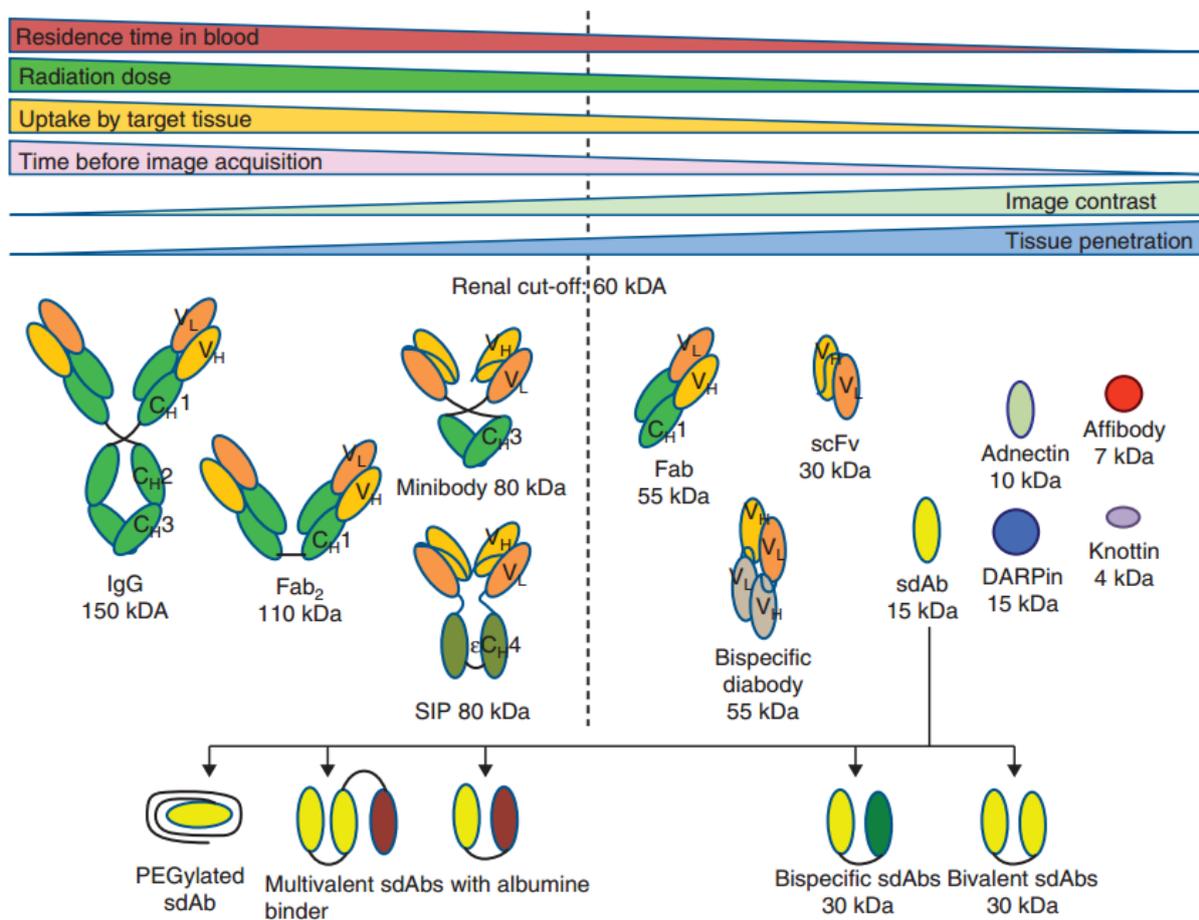


Figure 61 : Différentes variantes d'anticorps et leurs caractéristiques (Olafsen and Wu, 2010).

Afin d'améliorer la pénétration tissulaire l'ingénierie a cherché à réduire encore la taille des dérivés d'anticorps. Les scFv ne sont pas à proprement parler des fragments d'anticorps mais plutôt une construction inédite. Les scFv sont un assemblage des régions variables des chaînes lourdes et légère reliées entre elles par un linker, l'ensemble pesant environ 25 kDa. Le scFv est à l'origine de différentes constructions de tailles et propriétés différentes (Wu and Senter, 2005) (Figure 62, a.). Ces constructions à base d'associations de plusieurs scFv (diabody, tetrabody ou minibody par exemple) ont été développées afin d'améliorer la valence du scFv et augmenter sa rétention dans les tumeurs, cibles d'intérêt initiales de ces vecteurs (Figure 62, b.).

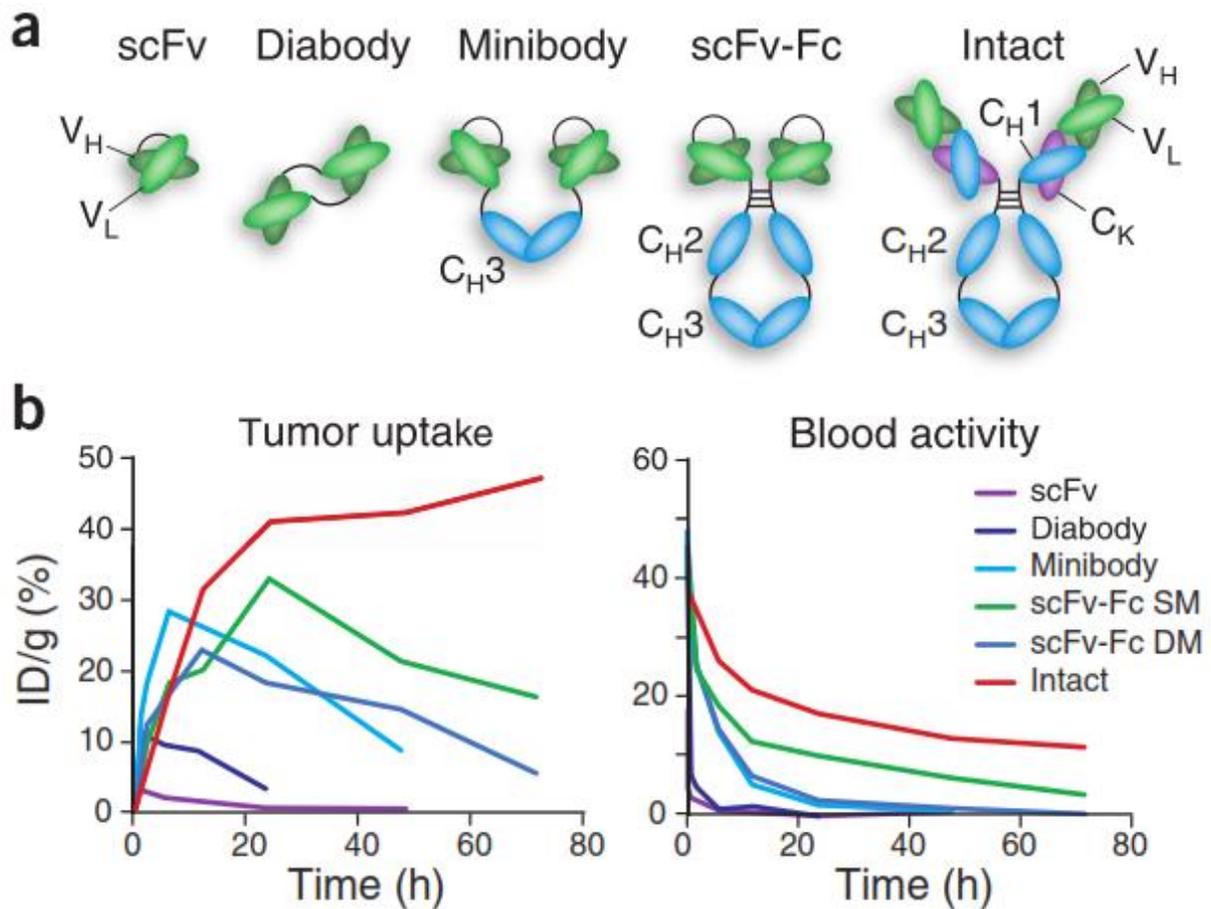


Figure 62 : Différentes construction dérivées des scFv. a : assemblages de plusieurs scFv. b : cinétiques de captation tumorale (à gauche) et sanguine (à droite) de ces constructions, la taille de l'assemblage modifie les cinétiques de captation (Wu and Senter, 2005).

b. Les nanobodies

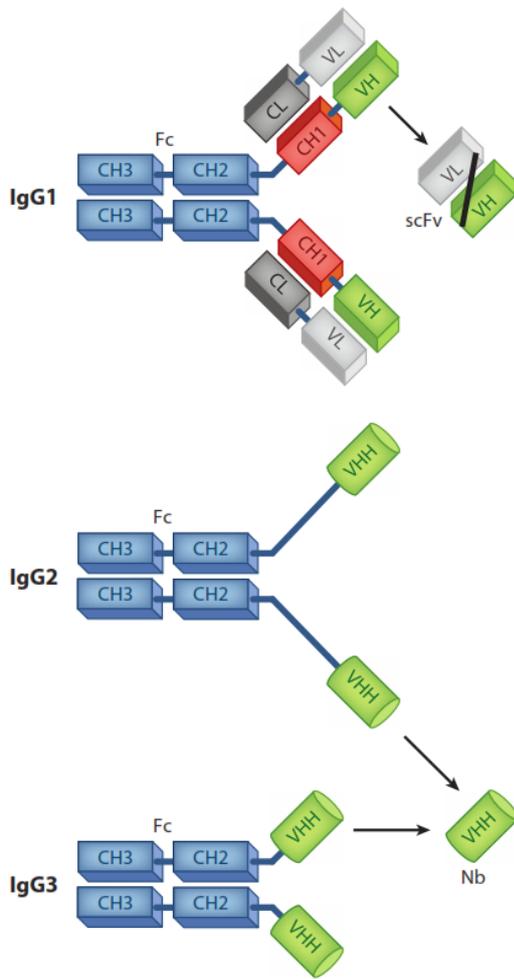


Figure 63 : Représentation schématique des anticorps présents dans le sang des camélidés. IgG1 : anticorps hétérodimérique conventionnel des mammifères, IgG2 et IgG3 : HCabs (Heavy Chains antibodies), anticorps homodimériques spécifiques des camélidés. IgG2 se différencie de IgG3 par une zone charnière plus longue entre le VHH et les domaines CH2 et CH3 (Muyldermans, 2013).

Si la structure des anticorps classiques (Immunoglobulines G ou IgG) est plutôt hautement conservée chez les mammifères il existe toutefois des exceptions. Ainsi il est possible de retrouver une autre forme d'IgG chez les camélidés (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). En plus des IgG de structure hétérotetramérique conventionnelle, ces animaux (chameaux, dromadaires, lamas, vigognes, alpagas) produisent un type d'IgG appelées HCabs (Heavy Chains antibodies), dénuées de chaîne légère et de domaine constant CH1 (Figure 63) (Muyldermans, 2013). Le pourcentage de HCabs présents chez les camélidés est variable en fonction de l'espèce, d'environ 80% pour les chameaux et dromadaire à environ 10% pour les espèces sud-américaines (Blanc *et al.*, 2009). En absence de chaîne légère et de domaine CH1, l'extrémité N-terminale de l'IgG, variable et destinée à la reconnaissance de l'antigène, est alors réduite à un unique domaine appelé VHH. Ce VHH est le plus petit fragment fonctionnel pour la reconnaissance de l'antigène dans un HCabs. Il s'agit de

l'équivalent fonctionnel du Fab des IgG conventionnelles, pour une taille de seulement 15 kDa (contre 55 kDa pour le Fab). Une fois isolé ce VHH devient un fragment d'anticorps appelé nanobody.

La production de ces fragments d'anticorps à domaine unique est subdivisée en plusieurs étapes (Holliger and Hudson, 2005; Muyldermans, 2013). La première

est généralement l'immunisation d'un camélidé par l'antigène d'intérêt. Il est ensuite possible de récupérer les lymphocytes présents dans la circulation périphérique par des prélèvements sanguins. Leurs ARNm sont ensuite extraits et les séquences correspondantes aux VHH peuvent alors être amplifiées en RT-PCR grâce à des *primers* spécifiques. Ce répertoire d'ARNm contient ainsi l'ARNm permettant d'exprimer le VHH dirigé contre l'antigène d'intérêt mais aussi de nombreux autres, il est donc nécessaire de réaliser une sélection. Pour cela, la technique la plus utilisée est le phage display. Cette technique consiste, tout d'abord, en la construction d'une banque de bactériophages exprimant la protéine d'intérêt, les VHH, à leur surface. Ces phages sont ensuite présentés à l'antigène d'intérêt, immobilisé sur un support. Les phages ainsi fixés à l'antigène d'intérêt seront ceux exprimant le VHH désiré (Figure 64) (Zafra *et al.*, 2011).

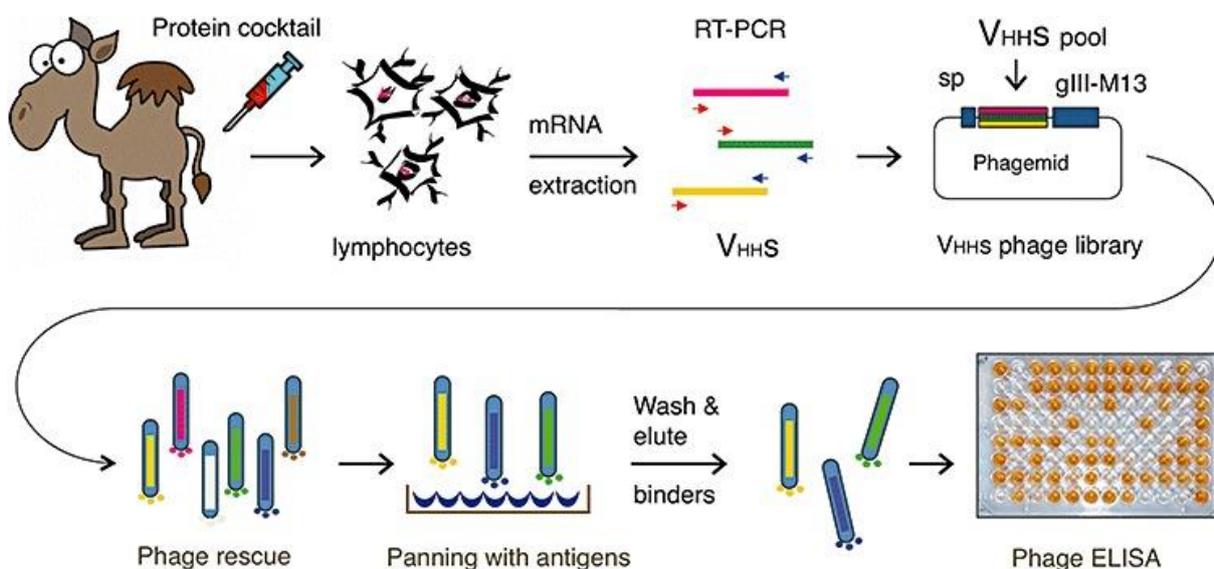


Figure 64 : Processus de production et de sélection des nanobodies (Zafra *et al.*, 2011). Le camélidé est tout d'abord immunisé avec l'antigène d'intérêt. Les ARN issus des lymphocytes du camélidé sont extraits, rétrotranscrits en ADN et amplifiés. La sélection de la séquence est alors réalisée par la technique de phage display. Les clones présentant la meilleure affinité pour l'antigène d'origine sont alors conservés pour de plus amples études.

Les VHH ainsi identifiés, il est alors possible de les faire produire par des systèmes de culture en micro-organismes eucaryotes ou procaryotes. L'absence de nécessité de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, nécessaires lors de la production d'IgG conventionnelles, permet de s'affranchir d'un mode de production *via* des cellules mammaliennes. La méthode de production choisie ainsi le plus fréquemment est celle utilisant *Escherichia coli*, car elle offre

une grande productivité et des facilités de manipulation importantes tout en conservant un coût faible de mise en œuvre et d'entretien (Spadiut *et al.*, 2014).

c. VCAM-1

VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ou CD106 est une glycoprotéine transmembranaire de 110 kDa faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. VCAM-1 a été caractérisée pour la première fois en 1989, et identifiée comme participant au recrutement des leucocytes dans les sites inflammatoires (Osborn *et al.*, 1989). Cette étude a montré que VCAM-1 était exprimée à la surface des cellules endothéliales dans les heures suivant leur stimulation par les cytokines inflammatoires, l'IL-1 ou le TNF- α . Cette induction persistant pendant plus de 72 heures suggère un rôle dans l'inflammation à la fois aiguë et chronique. VCAM-1 fonctionne comme un récepteur à l'intégrine VLA-4 (Very Late Antigen-4), protéine transmembranaire présente dans la membrane plasmique des leucocytes. Ainsi, VCAM-1 permet le guidage des leucocytes circulants vers les cellules endothéliales activées, puis leur adhésion (Figure 65) (Khan *et al.*, 2010). VCAM-1 joue donc un rôle important dans le développement de l'inflammation tissulaire, les leucocytes ainsi adhérents migrant à travers la barrière endothéliale afin de se différencier notamment en macrophages au sein du tissu.

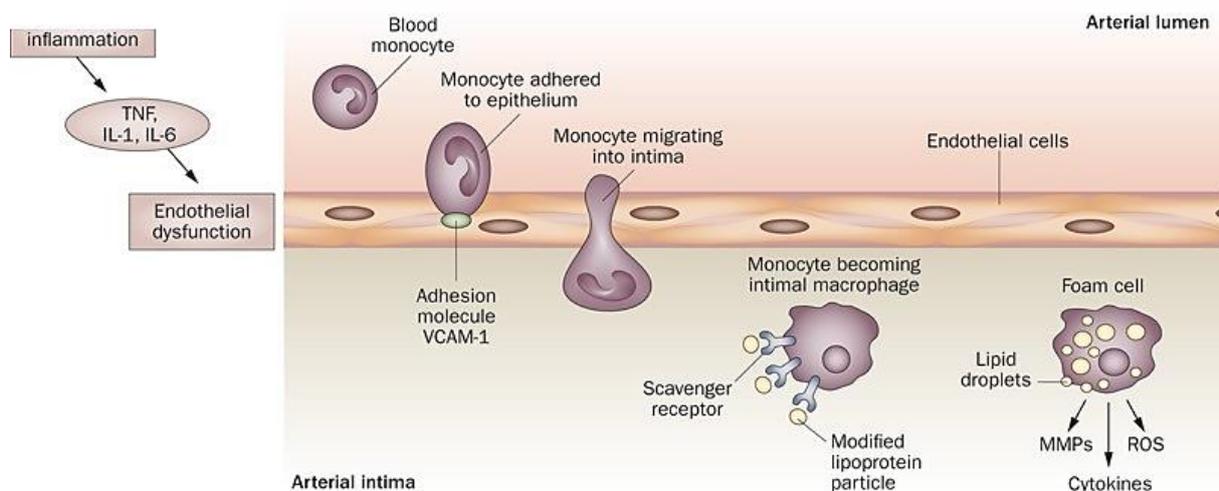


Figure 65 : Rôle de VCAM-1 dans le recrutement des monocytes circulants. Les monocytes adhérents à l'endothélium grâce à VCAM-1 passent dans l'intima par un processus de diapédèse et se transforment en macrophages (Khan *et al.*, 2010).

VCAM-1 dans l'athérosclérose

"L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media." (Définition de l'OMS). C'est une maladie vasculaire chronique, très répandue, le développement des plaques d'athérome étant un phénomène physiologique pouvant apparaître dès le stade fœtal (Insull, 2009). Des facteurs génétiques et environnementaux comme l'alimentation, la sédentarité, l'hypercholestérolémie ou l'hypertension peuvent favoriser le développement de ces plaques. Si la grande majorité de ces plaques sont asymptomatiques, leur épaissement progressif dans la lumière vasculaire peut conduire à l'obstruction de cette dernière. Cette sténose, selon son site d'apparition, peut alors entraîner des symptômes tels que des douleurs localisées, des vertiges, des essoufflements, des troubles de la vision ou encore des modifications du rythme cardiaque. L'obstruction d'une artère coronaire peut même conduire à l'angine de poitrine. Toutefois, ces plaques d'athérome sténosantes, qualifiées de stable et présentant des symptômes, peuvent être rapidement diagnostiquées par des techniques d'angiographie standard. Au contraire il existe un autre type de plaques, dites vulnérables, instables et sujettes à la rupture (Fuster *et al.*, 2005). Contrairement aux plaques stables, présentant une capsule solide et un contenu plutôt fibreux, les plaques d'athérome vulnérables présentent un important cœur lipidique et nécrotique avec une fine capsule fibreuse. Leur rupture entraîne la libération de leur contenu dans la circulation sanguine causant un thrombus au point de rupture, ou dans les vaisseaux plus petits en aval de cette dernière, à l'origine de l'infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux. Ces plaques, peu sténosantes, et donc asymptomatiques jusqu'à leur rupture, ne sont pas facilement détectables et sont

responsables d'environ 80% des cas de morts subites. L'apparition de phénomènes inflammatoires au sein de la plaque, liés à l'infiltration des monocytes circulants en son sein est un point crucial du développement de la plaque d'athérome vers un phénotype vulnérable (Libby *et al.*, 2011). Les molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou ICAM-1 sont responsables de l'infiltration des cellules immunitaires au sein de cette plaque. Ces cellules alors différenciées en macrophages phagocytent les lipoprotéines présentes dans le tissu vasculaire, se transformant ainsi en cellules spumeuses, chargées de lipides, produisant des cytokines inflammatoires, des ROS et des métalloprotéases de la matrice. L'accumulation des cellules spumeuses et l'exacerbation des réactions inflammatoires va causer l'instabilité de la plaque en provoquant la formation d'un cœur lipidique et nécrotique instable (Figure 66) (Libby *et al.*, 2011).

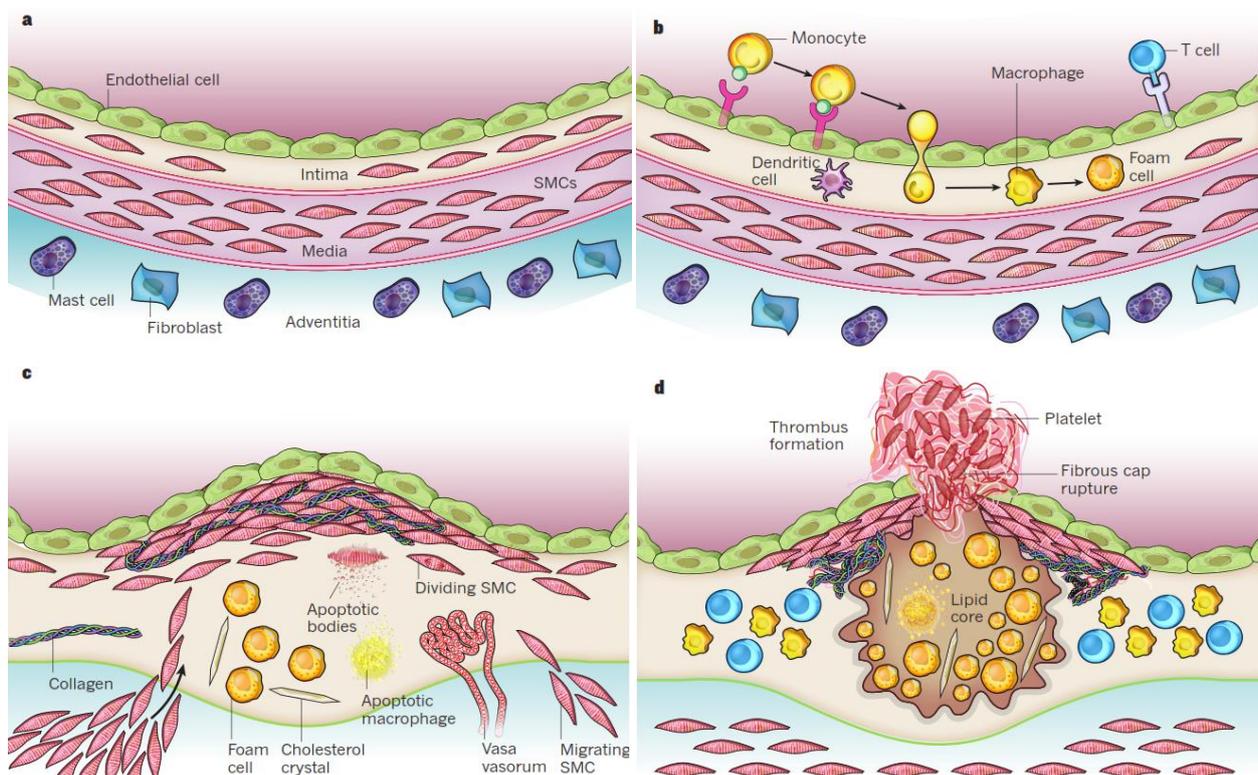


Figure 66 : Développement et rupture de la plaque d'athérome vulnérable. a : paroi artérielle normale. b : les leucocytes circulants adhèrent à l'endothélium avant de migrer dans l'intima. c : la lésion progresse avec la migration des cellules musculaires lisses de la media à l'intima. Les cellules musculaires lisses et les macrophages, en grand nombre, peuvent mourir et causer la formation de corps apoptotiques qui vont s'accumuler au centre de la plaque et participer à la formation d'un cœur nécrotique et lipidique. d : la chape fibreuse de la plaque se rompt, libérant son contenu dans la circulation sanguine et provoquant ainsi un thrombus (Libby *et al.*, 2011).

Comme l'infiltration des leucocytes dans la paroi vasculaire est un point critique de l'évolution de la plaque, des études se sont alors intéressées à l'implication des molécules d'adhésion dans le développement des plaques d'athérome vulnérables. Il a alors été montré que VCAM-1 était un facteur de risque important et indispensable de la progression des plaques d'athérome vers un phénotype vulnérable (Fuster *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 1993).

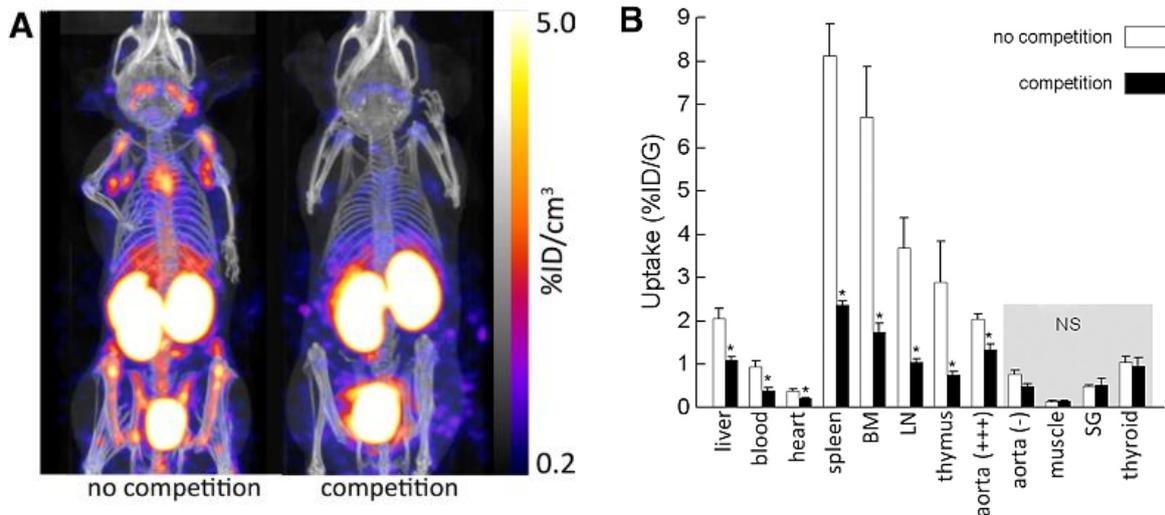


Figure 67 : ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables. ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a été injecté à des souris ApoE^{-/-} soit seul (n=4) soit avec un compétiteur non marqué (cAbVCAM1-1) 100 fois en excès (n=6). A : images SPECT/CT représentatives. B : biodistribution *ex vivo* 3 heures après injection. La compétition diminue la captation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans le foie, les tissus lymphoïdes et les lésions athérosclérotiques, montrant ainsi la spécificité du signal obtenu en SPECT. * *p* < 0,05 versus sans compétition (Broisat *et al.*, 2012).

Malgré l'intérêt porté dans le domaine de l'imagerie moléculaire et les diverses avancées dans la compréhension de la pathologie, il n'existe à ce jour aucune technique d'imagerie permettant de diagnostiquer les plaques d'athérome vulnérables en pratique clinique, de manière non invasive. C'est dans le contexte scientifique développé ci-dessus qu'a été développé au laboratoire ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, un nouvel agent d'imagerie des plaques d'athérome vulnérables (Broisat *et al.*, 2014, 2012). VCAM-1 s'est avérée être une cible de choix, spécifique aux plaques d'athérome vulnérables. Le traceur, grâce à sa construction basée sur un nanobody, a su montrer une excellente affinité pour sa cible, de l'ordre du nanomolaire. L'imagerie SPECT a permis de mettre en évidence une captation spécifique dans les lésions athérosclérotiques tout en montrant une activité

sanguine suffisamment faible pour proposer un ratio signal/bruit satisfaisant (Figure 67) (Broisat *et al.*, 2012).

VCAM-1 dans la NASH

VCAM-1, de par son rôle indispensable dans l'infiltration tissulaire des leucocytes circulants, participe grandement à l'installation de l'inflammation tissulaire. L'affirmation de l'inflammation hépatique étant l'élément marquant l'évolution de la stéatose hépatique vers la NASH, l'infiltration des monocytes circulants en vue de leur différenciation en cellules de Kupffer, est un phénomène important. Ainsi VCAM-1 joue un rôle important dans l'inflammation hépatique, avec une expression basale quasi nulle par les cellules de Kupffer, mais qui se trouve augmentée et généralisée aux cellules épithéliales vasculaires en conditions pathologiques (Adams *et al.*, 1994; Steinhoff *et al.*, 1993). L'étude de Steinhoff, portant sur les stéatohépatites alcooliques, a même montré que l'expression de VCAM-1 était significativement augmentée d'un stade à l'autre de l'évolution de la maladie, de la stéatose à la cirrhose en passant par l'hépatite.

De nombreuses études s'intéressant à la pathogenèse ou à l'élaboration de traitements de la NASH se sont intéressées à la mesure de l'expression des acteurs de l'inflammation dans l'évolution de la pathologie. Ainsi, les expressions de VCAM-1, de MCP1 ou encore du TNF- α , stimulant l'expression des 2 précédents, se retrouvent fréquemment suivies dans de nombreuses études (Ip *et al.*, 2004b; Kudo *et al.*, 2009; Kushikata *et al.*, 2005; Pathil *et al.*, 2012; Yao, 2014; Zhang *et al.*, 2009). Ces observations faites et le traceur cAbVCAM1-5 étant disponible au laboratoire, l'opportunité d'évaluer la capacité de ce traceur à suivre l'inflammation dans un modèle murin de NASH semblait évidente.

7) Présentation de l'étude

Malgré la prévalence grandissante des NAFLD, les cliniciens manquent d'outils diagnostiques et thérapeutiques pour faire face à cette pathologie (Leite, 2014). L'unité Inserm 1039 a récemment développé un agent d'imagerie ciblant le processus inflammatoire, afin de diagnostiquer la présence de plaques d'athérome vulnérables dans la paroi des artères (Broisat *et al.*, 2012, 2014). Ce traceur dénommé cAbVCAM1-5 est en cours de transfert clinique pour cette application. L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel de cet agent d'imagerie dans le contexte de la NASH, sur un modèle murin. Le modèle utilisé ici est un modèle de NASH nutritionnelle impliquant un régime MCD (Methionine Choline Deficient) (Itagaki *et al.*, 2013).

Un tel outil pourrait être pertinent pour réaliser le suivi longitudinal de la NASH afin de mieux la caractériser. En effet à l'heure actuelle, la stéatose peut être diagnostiquée par diverses techniques d'imagerie, toutefois cette phase de la pathologie étant bénigne cela présente peu d'intérêt. La fibrose peut également être diagnostiquée, mais contrairement à la stéatose elle témoigne d'une phase tardive de la maladie parfois irréversible. Le besoin d'une technique diagnostique basée sur une étape intermédiaire, l'inflammation, est donc évident. Cette nouvelle technique pourrait également permettre d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques impactant les phénomènes inflammatoires.

II. Matériel et méthodes expérimentales

1) Méthode proposée

1. Modèle d'étude

Le protocole d'expérimental a été préalablement validé par le comité d'éthique local (n°12, Com-Eth Grenoble) et autorisé par le ministère (#2479-2015102911274723v4). Des souris C57Bl/6J mâles (n=40) de 12 semaines sont utilisées (Charles River, France). Les animaux sont stabulés au minimum une semaine en animalerie avant le début de l'expérimentation, avec de l'eau et de la nourriture standard (SAFE A04) *ad libitum*. Quatre groupes ont été constitués (Figure 68).

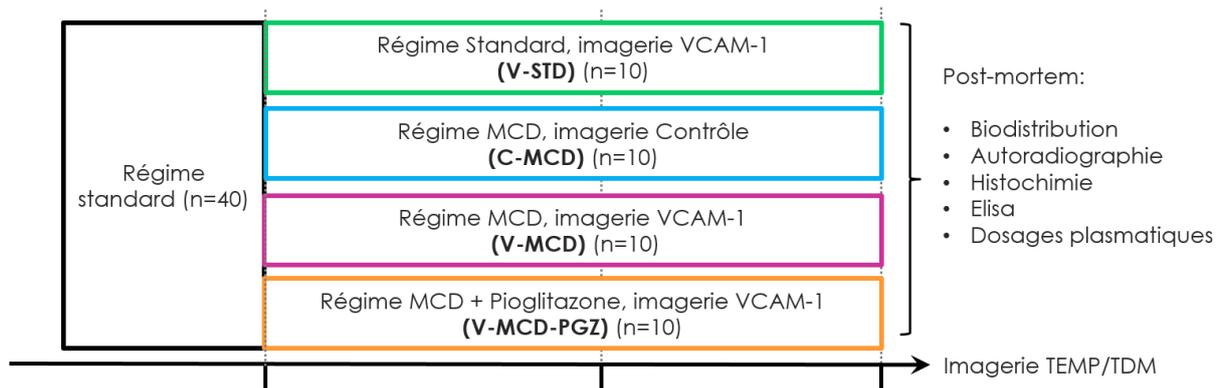


Figure 68 : Protocole d'étude pour l'évaluation de la faisabilité de l'imagerie de l'inflammation hépatique grâce au traceur cAbVCAM1-5 dans un modèle murin de NASH. Le premier groupe (V-STD) de souris est un groupe contrôle, nourri avec un régime standard. Le deuxième groupe (C-MCD) est un groupe nourri avec un régime MCD mais imagé avec un traceur contrôle, aspécifique. Le troisième groupe (V-MCD) est nourri avec un régime MCD et imagé avec le traceur anti VCAM-1. Le dernier groupe (V-MCD) reçoit en plus un traitement visant à faire diminuer l'inflammation.

Le premier groupe est dédié à l'imagerie de VCAM-1 chez des souris nourries avec un régime standard n'induisant pas de NASH (groupe V-STD, n=10). Le second groupe est dédié à l'imagerie avec un nanobody contrôle non spécifique de VCAM-1 (Broisat *et al.*, 2012) chez des souris nourries avec un régime MCD (MCD diet, Research Diet) induisant la NASH (groupe C-MCD, n=10). Le troisième groupe est dédié à l'imagerie de VCAM-1 chez des souris nourries avec un régime MCD (groupe V-MCD, n=9). Enfin, le quatrième groupe est dédié à l'imagerie de

VCAM-1 chez des souris nourries avec un régime MCD supplémenté en pioglitazone, de la famille des thiazolidinédiones (0,012%, Research Diets) (groupe V-MCD-PGZ, n=10). La variation de masse corporelle des animaux est évaluée à raison de 3 mesures par semaine.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés dès le début de l'étude, puis lors de chaque imagerie SPECT/CT (NanoSPECT/CT, Bioscan, Mediso). Le sang a été centrifugé à 10000 G et 40 μ L de plasma ont été congelés pour un dosage ultérieur de l'enzyme hépatique Alanine Amino Transférase (ALT) comme indicateur des dommages hépatiques.

L'imagerie SPECT est réalisée au temps initial (0 semaine), au temps intermédiaire (4 semaines), puis au temps final (8 semaines). À l'issue de la dernière acquisition SPECT/CT, des études *ex vivo* ont été réalisées. Le protocole expérimental est présenté sur la figure 68.

2. Préparation du traceur

Le nanobody cAbVCAM1-5 a été radiomarqué au ^{99m}Tc sur son site spécifique "tag polyhistidine" (queue de 6 résidus histidine en Cter) *via* la méthode tricarbonyle précédemment décrite (Alberto *et al.*, 2001; Broisat *et al.*, 2012). La méthodologie de marquage comporte une première étape qui consiste à former le précurseur ($[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO}_3)]^+$) via le kit commercial tricarbonyle (PSI, Suisse). Au cours de la seconde étape, le précurseur ainsi formé échange rapidement ses molécules d'eau pour se complexer au "tag histidine" (ligands donneurs d'électrons). Brièvement, 1 mL de $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ -pertechnétate (2.5–3GBq) est incubé avec le kit pendant 20 min à 100°C pour former le précurseur Tc-tricarbonyle. Après neutralisation (pH 6,5-7), 500 μ L du précurseur sont ajoutés à 50 μ g d'une solution cAbVCAM1-5 (1mg/mL). La solution est incubée pendant 45 min à 75°C et ensuite purifiée sur une colonne Sephadex G25 (NAP-5, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) avec du PBS, avant d'être passée sur un filtre 0,22 μ m Millex (Millipore, Bedford, MA, USA).

La pureté radiochimique est déterminée par RP-HPLC. Une bonne pureté radiochimique (> 98%) est observée, ainsi qu'une bonne stabilité dans le milieu de marquage 24h après marquage (Figure 69).

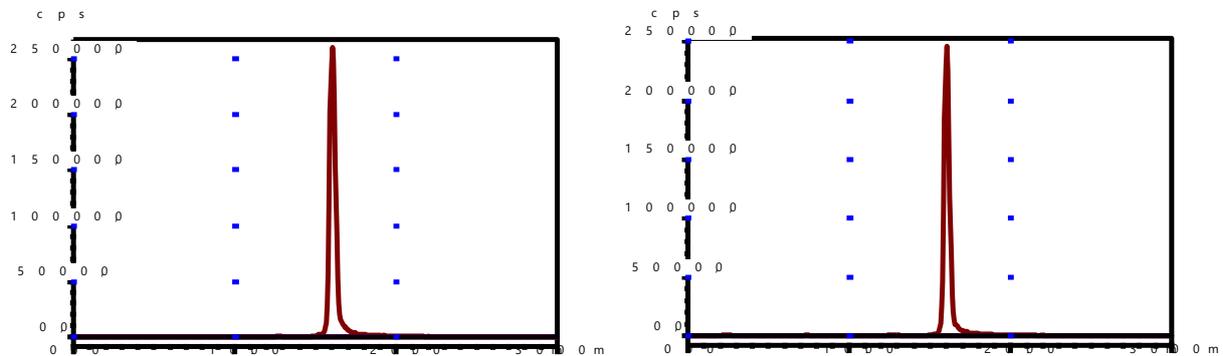


Figure 69 : Profils HPLC du cAbVCAM1-5 marqué au ^{99m}Tc . À gauche, immédiatement après le radiomarquage. À droite, 24 heures après le radiomarquage.

3. Imagerie SPECT/CT

Les nanobodies cAbVCAM1-5 et contrôle (cAbBcII10) sont radiomarqués au technétium-99m (R_γ : 140 keV, $T_{1/2}$: 6,02 h) en utilisant la méthode tricarbonyle. Afin de réaliser l'imagerie SPECT, $48,37 \pm 10,3$ MBq de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 ou ^{99m}Tc -cAbBcII10 sont injectés dans une des veines latérales de la queue des souris. Deux heures après l'injection du traceur, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane (1,5% dans un mélange oxygène/air 1:1) et l'imagerie SPECT/CT est réalisée à l'aide de la nano-SPECT-CT, caméra préclinique dédiée au petit animal (Bioscan/Medis). La température des animaux est régulée durant l'acquisition, et leur fréquence respiratoire monitorée afin d'ajuster, si nécessaire, le degré d'anesthésie. L'acquisition CT est réalisée en premier (45 kV, 240 projections, 1000 ms par projection), puis une acquisition SPECT de 45 minutes sur un unique champ de vue est réalisée (24 projections, 225 s par projections).

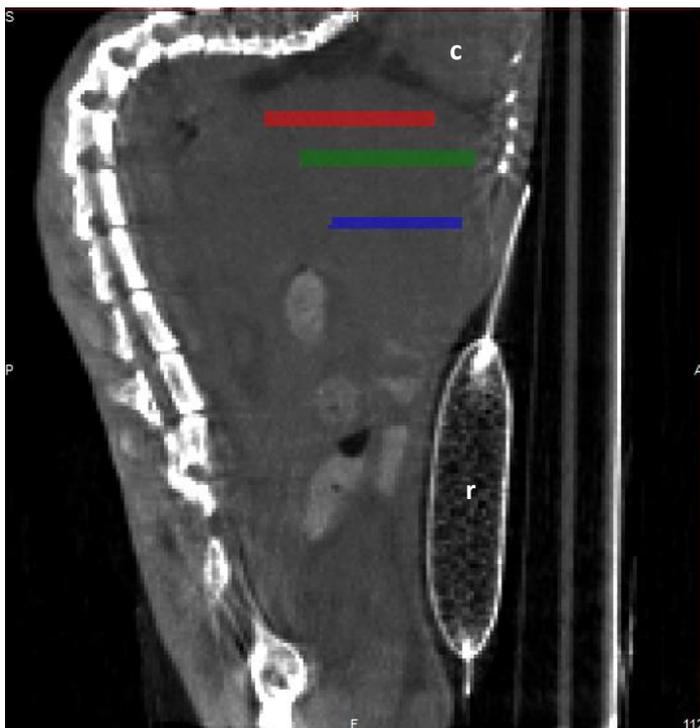


Figure 70 : Vue anatomique en coupe sagittale, obtenue par scanner à rayons X. 3 volumes d'intérêt ont été placés à différents niveaux de coupe du foie (1, 2, 3) (c : cœur, r : coussinet permettant de mesurer la respiration).

Les acquisitions SPECT et CT sont reconstruites afin d'obtenir les volumes tridimensionnels, puis elles sont fusionnées et analysées à l'aide du logiciel InvivoScope (In vivo). Des volumes d'intérêt (VOI) sont définis en se basant sur les images anatomiques obtenues grâce à l'imagerie CT. Trois VOI ont ainsi été dessinés depuis le pôle supérieur du foie jusqu'à son pôle inférieur afin de quantifier la fixation du traceur (Figure 70). Les résultats sont exprimés en SUV (*standardized uptake value*, ou

valeur de captation standardisée) afin de s'affranchir de la différence de masse corporelle entre les groupes d'animaux. Cette grandeur correspond à l'activité (en MBq) captée par centimètre cube de tissu, corrigée de la dose injectée (en MBq) et de la masse corporelle de l'animal (en g). En admettant que $1\text{cm}^3 \sim 1\text{g}$ pour la plupart des organes, il s'agit d'une grandeur sans unité.

$$SUV = \left(\frac{\text{fixation dans le tissu en MBq/gramme}}{\text{Dose injectée en MBq}} \right) \times \text{poids de l'animal en gramme}$$

4. Biodistribution

À l'issue de l'imagerie finale (8 semaines) et trois heures après l'injection du radiotracer, les animaux encore sous anesthésie sont sacrifiés par inhalation de CO_2 . Des échantillons d'organes sont prélevés, rincés et pesés. La fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5 ou du nanobody contrôle est déterminée par la mesure de la radioactivité avec un compteur gamma (Wizard², PerkinElmer) pour chacun des

échantillons prélevés. Les résultats ont été corrigés de la dose injectée, de la masse de l'organe et de l'animal, et sont exprimés en SUV comme décrit ci-dessus.

5. Autoradiographie

Les prélèvements de foie sont placés dans du gel à congélation (OCT compound (Tissue Tek)) et congelés dans de l'isopentane à -40°C. Des coupes de 20 µm d'épaisseur sont réalisées à deux niveaux du tissu hépatique à l'aide d'un cryotome (HM505E, Microm), puis exposées 24h sur des films autoradiographiques sensibles aux émissions radioactives. Ces films sont alors scannés à l'aide d'un phospho-imager (BAS5000, Fuji).

6. Histologie et immunohistologie

Des coupes de 8 µm d'épaisseur, adjacentes à celles dédiées à l'autoradiographie sont réalisées à l'aide d'un cryotome (HM505E, Microm) afin de réaliser les colorations histologiques et immunohistologiques suivantes :

a. Coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran)

Les coupes sont fixées par incubation dans l'acétone pendant 5 min à -20°C. Une coloration HES est ensuite réalisée afin de visualiser le cytoplasme (rose), les noyaux (bleu) et le tissu conjonctif (orangé).

b. Coloration Oil Red-O

Les coupes sont fixées pendant 10 min dans la formaline 10%, puis colorées pendant 120 min à 60°C avec une solution Oil Red-O (ORO) afin de mettre en évidence les vacuoles lipidiques. Elles sont alors lavées au propylène-glycol 85% pendant 5 min afin de mettre en évidence les lipides.

c. Immunohistochimie anti-Mac-2

Les coupes sont fixées pendant 10 min dans l'acétone à -20°C. Afin de mettre en évidence les macrophages activés, les lames sont incubées avec un anticorps anti-Mac-2 de rat (dilution 1/500, anticorps monoclonal, CedarlaneLabs). L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps secondaire de lapin, biotinylé, anti-rat (dilution 1/500, VectorLab). La révélation est réalisée par la méthode ABC (Vector), en utilisant le 3-3'diaminobenzidine (DAB) comme chromogène.

7. ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay)

Cinq (5) mg de chacun des foies sont broyés dans 100 μ L de Tampon RIPA (Tris-HCL 50 mM, pH : 8, NaCl 150 mM, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, sodium orthovanadate 1 mM, 1% inhibiteur de protéase). Le lysat est centrifugé à 10 000 G pendant 10 min à 4°C, le surnageant est récupéré. Les protéines totales sont dosées par la méthode Pierce BCA selon les recommandations du fabricant (kit Pierce BCA protein assay, ThermoFisher). La quantité de protéine VCAM-1 est évaluée à l'aide d'un kit Elisa, en suivant les recommandations du fabricant (Quantikine ELISA R&D systems).

8. Dosage enzymatique

L'activité ALT est dosée à partir du plasma des souris mises sous régime standard, MCD et MCD + Pioglitazone, après 4 et 8 semaines, en utilisant le kit commercial ALT Activity Assay Kit (Sigma Aldrich). L'unité internationale de mesure correspond à la quantité d'enzyme qui génère 1 nmole de pyruvate par minute à 37°C.

9. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel Medcalc (Medcalc Software). Les tests non-paramétriques de Wilcoxon & Friedman et de Mann-Whitney sont utilisés pour évaluer les différences statistiques entre valeurs appariées et non-appariées, respectivement. Un test ANOVA à un facteur permet d'analyser les différences statistiques au sein d'un même groupe aux différents temps de l'expérimentation. Enfin les corrélations linéaires ont été évaluées grâce au calcul du coefficient de corrélation de rang du *tau* de Kendall. Une différence est considérée comme statistiquement significative lorsque $p < 0,05$.

2) Sensibilité de la méthode proposée

Le modèle animal est le même que précédemment, un régime MCD induira le développement de la pathologie. Toutefois en se basant sur les résultats obtenus lors de la première partie de l'étude, le régime durera ici seulement 4 semaines au lieu de 8. Le protocole d'expérimentation a été préalablement validé par le comité d'éthique local (n°12, Com-Eth Grenoble) et autorisé par le ministère (#2993-2015120219565475v2). Des souris C57Bl/6J mâles (n=36) de 12 semaines sont utilisées (Charles River, France). Les animaux sont stabulés au minimum une semaine en animalerie avant le début de l'expérimentation, avec de l'eau et de la nourriture standard (SAFE A04) *ad libitum*. Quatre groupes ont été constitués (Figure 71).

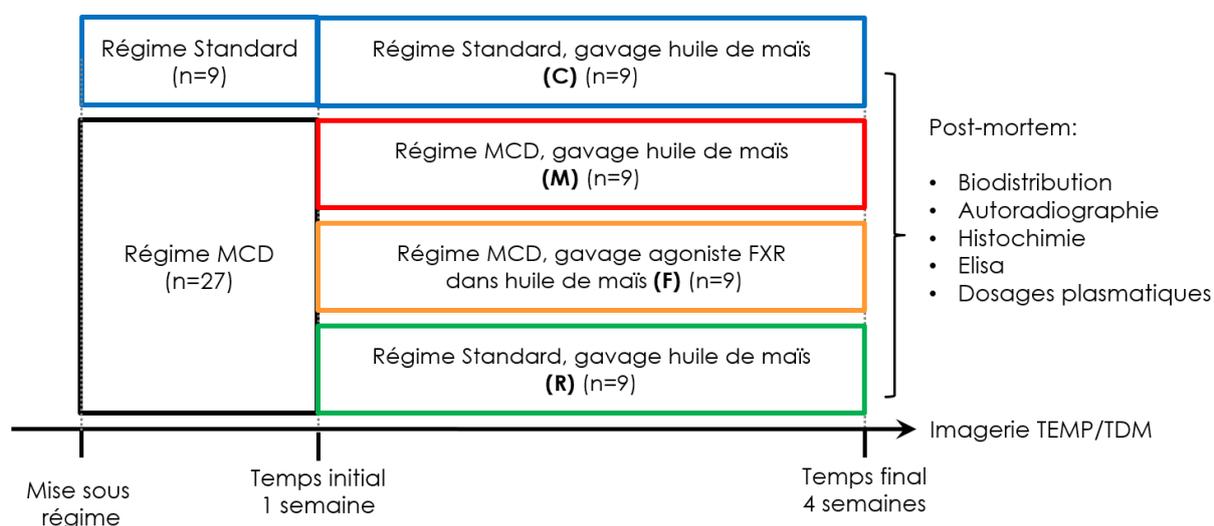


Figure 71 : Protocole d'étude pour l'évaluation de la sensibilité de la méthode. Le groupe C est un groupe contrôle, nourri avec un régime standard pendant 4 semaines. Le groupe M est nourri avec un régime MCD pendant 4 semaines. Le groupe F est nourri avec un régime MCD et traité avec un agoniste de FXR. Le groupe R est nourri pendant une semaine avec un régime standard puis pendant les trois dernières semaines avec un régime standard.

Le premier groupe est un groupe contrôle (groupe C, n=9), nourri avec un régime standard pendant 4 semaines. Les deuxième et troisième groupes (groupe M, n=9 et groupe F ; n=9) sont nourris pendant 3 semaines avec un régime MCD après 1 semaine de régime standard. Le groupe F reçoit en gavage oral quotidien (30 mg/kg) un traitement à base d'agoniste de FXR, le turofexorate isopropyl (WAY-362450, Selleckchem). Le WAY-36240 est dissout dans de l'huile de maïs (3 mg/mL), les animaux des autres groupes ont donc été gavés également pendant 3

semaines avec de l'huile de maïs seule, en quantités semblables aux souris traitées. La première semaine, toutes les souris sont gavées avec de petites quantités d'eau afin de les habituer à cette manipulation. Enfin, le dernier groupe (groupe R, n=9) est nourri avec le régime MCD la première semaine du protocole, puis avec un régime standard les 3 dernières semaines.

La variation de la masse corporelle des animaux est évaluée à raison de 3 mesures par semaine. Des prélèvements sanguins ont été réalisés lors de la première et de la dernière imagerie SPECT/CT. Le sang a été centrifugé et 40 µL de plasma ont été congelés pour un dosage ultérieur de l'enzyme hépatique ALT comme indicateur des dommages hépatiques.

Les acquisitions SPECT/CT des animaux des 4 groupes sont réalisées selon le même protocole que dans la partie précédente mais tous sont injectés avec le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$. Au terme de la séance d'imagerie à 4 semaines, les souris sont euthanasiées par inhalation de CO_2 , les mêmes études *ex vivo* que précédemment sont alors réalisées (biodistribution, histologie, ELISA et dosages enzymatiques détaillés en 1) Méthode proposée).

III. Résultats

1) Méthode proposée

1. Caractérisation du modèle

Les souris nourries avec le régime MCD ont perdu plus de 40% de leur masse corporelle en 8 semaines de régime (48%, 43,4% et 42,4% pour les groupes C-MCD, V-MCD et V-MCD-PGZ respectivement). Cette perte de poids intervient très rapidement dès la mise sous régime. Il n'y a pas de différence significative entre ces 3 groupes. Au contraire, les souris nourries avec un régime standard ne perdent pas de poids (Tableau 10) (Figure 72).

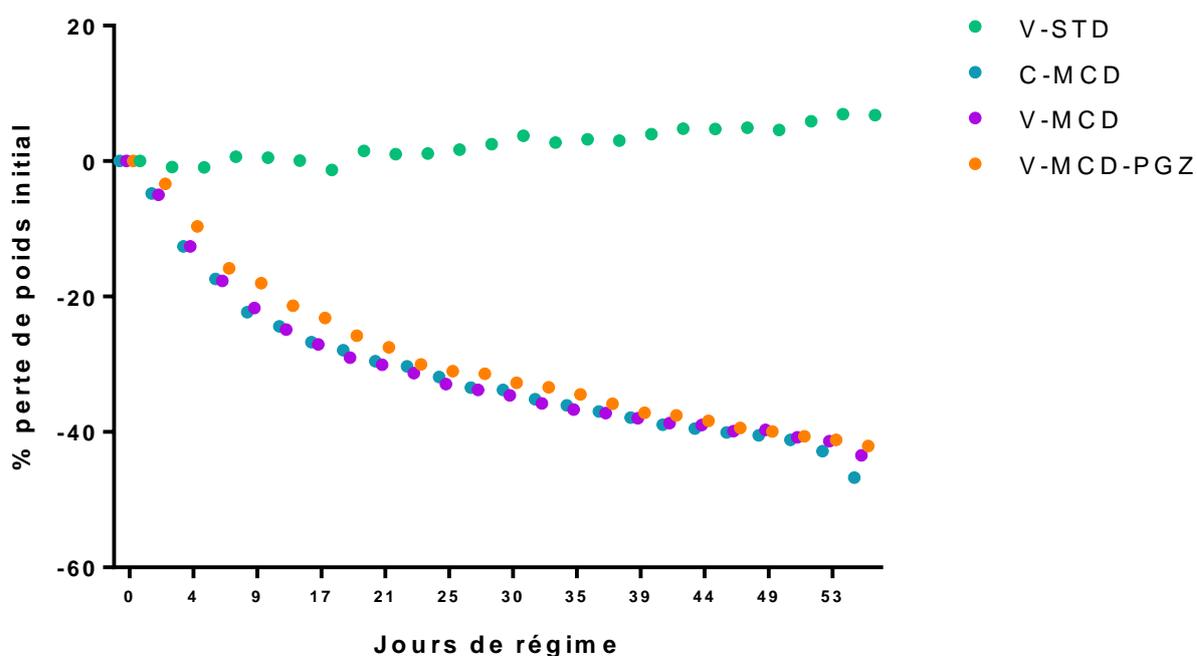


Figure 72 : Suivi de la masse corporelle des animaux au cours du traitement.

Poids (g)	V-STD	C-MCD	V-MCD	V-MCD-PGZ
Basal	27,00 ± 1,90	29,98 ± 2,52	29,39 ± 3,82	27,00 ± 2,07
4 semaines	27,97 ± 1,77	19,93 ± 1,52***	19,39 ± 2,11***	17,96 ± 2,01***
8 semaines	28,96 ± 1,75	16,68 ± 1,37***	16,68 ± 2,31***	15,5 ± 1,54***

Tableau 10 : Masse corporelle des animaux aux différents temps d'imagerie.

La coloration ORO renseigne sur l'accumulation de triglycérides sous forme de vésicules dans le tissu. Les souris des groupes C-MCD, V-MCD et V-MCD-PGZ montrent une accumulation similaire de gouttelettes lipidiques (en rouge) au sein des hépatocytes (Figure 73). Les coupes de foie des souris V-STD ne présentent pas de gouttelette lipidique.

L'immunohistologie de Mac-2 permet de mettre en évidence la présence de macrophages activés et donc d'un processus inflammatoire. Les souris sous régime standard ne présentent aucune infiltration de macrophage au contraire des souris nourries avec le régime MCD. Il n'y a pas de différence visuelle entre les souris des groupes V-MCD, C-MCD et V-MCD-PGZ (Figure 73).

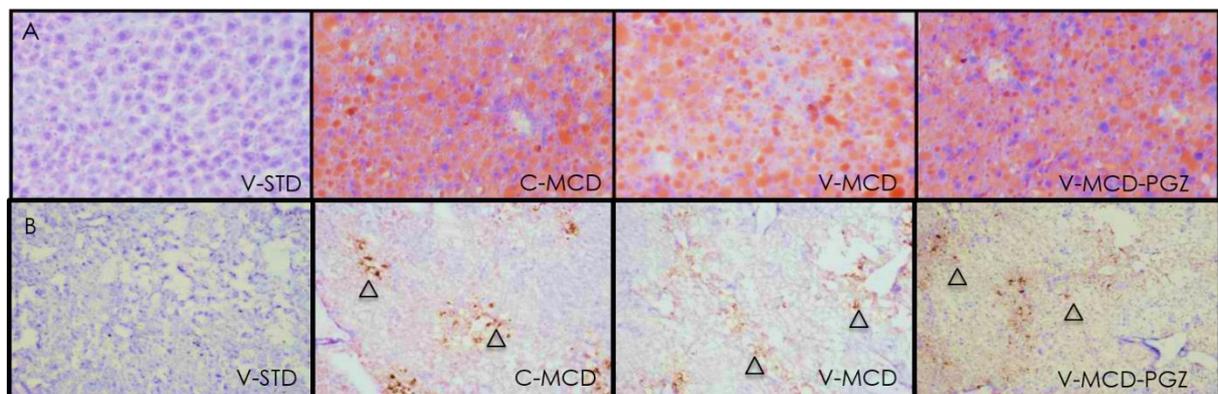


Figure 73 : Observations histologiques de coupes de foie. A : Coloration hématoxyline éosine safran (HES) et Oil-Red-O (ORO) ; B : Coloration HES et immuno marquage des macrophages activés (anticorps anti Mac-2) (flèches).

L'ALT sérique augmente avec la cytolysse des hépatocytes, elle renseigne donc sur "l'état de santé" du foie (Figure 74). Les souris du groupe V-STD présentent un taux d'ALT très bas à 4 et 8 semaines ($6,9 \pm 3,5$ et $5,9 \pm 2,3$ UI/L respectivement). Les souris des groupes V-MCD, C-MCD et V-MCD-PGZ présentent une activité ALT 10 fois plus élevée que les souris du groupe V-STD à 4 semaines ($60,5 \pm 39,8$ UI/L, $p = 0,0002$, $54,0 \pm 19,6$ UI/L, $p = 0,0002$ respectivement) et à 8 semaines ($59,7 \pm 39,8$ UI/L, $p = 0,0002$ et $51,0 \pm 30,0$ UI/L, $p = 0,0004$ respectivement). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes V-MCD et V-MCD-PGZ à 4 semaines ($p = 0,8501$) ou à 8 semaines ($p = 0,6334$). Les taux d'ALT n'augmentent pour aucun des groupes entre 4 et 8 semaines ($p = 0,7344$, $p = 0,9219$, $p = 0,4609$ pour les groupes V-STD, V-MCD et V-MCD-PGZ respectivement).

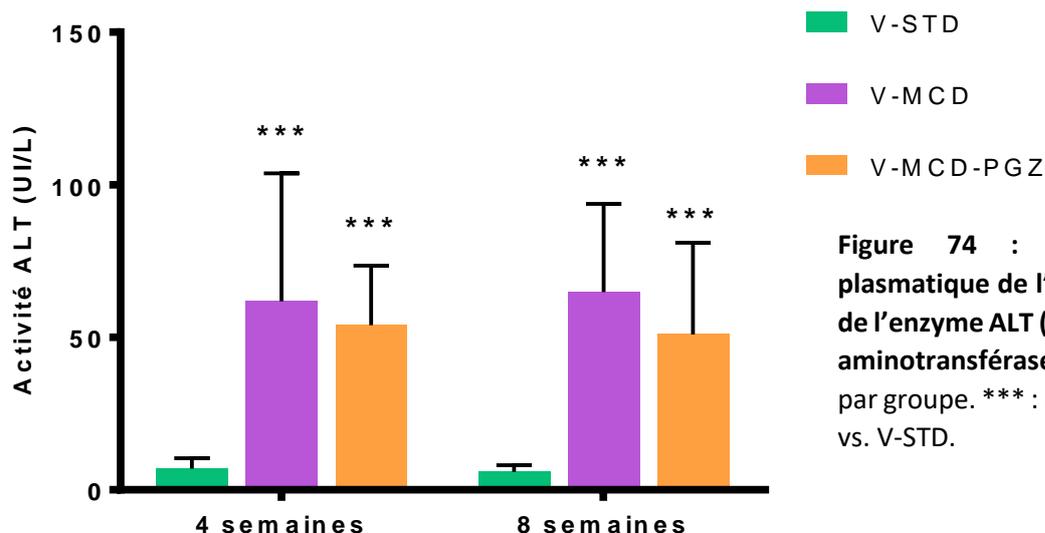


Figure 74 : Dosage plasmatique de l'activité de l'enzyme ALT (Alanine aminotransférase). n=9 par groupe. *** : p<0,001 vs. V-STD.

Un test ELISA permet de doser la quantité de cible, VCAM-1, présente dans le foie (Figure 75). Les souris du groupe V-STD présentent une quantité de VCAM-1 très faible ($1,06 \pm 0,48$ ng/mg protéine). La quantité de VCAM-1 hépatique est significativement plus élevée dans les groupes ayant reçu le régime MCD que dans le groupe V-STD ($5,53 \pm 1,13$, $5,78 \pm 2,14$ et $7,12 \pm 1,85$ ng/mg pour les groupes V-MCD, C-MCD et V-MCD-PGZ respectivement avec $p < 0,0001$ pour les trois groupes). Contrairement à nos attentes, le groupe V-MCD-PGZ présente une quantité de VCAM-1 significativement plus élevée que celle du groupe V-MCD ($7,12 \pm 1,85$ vs. $5,53 \pm 1,13$ ng/mg, $p = 0,0244$).

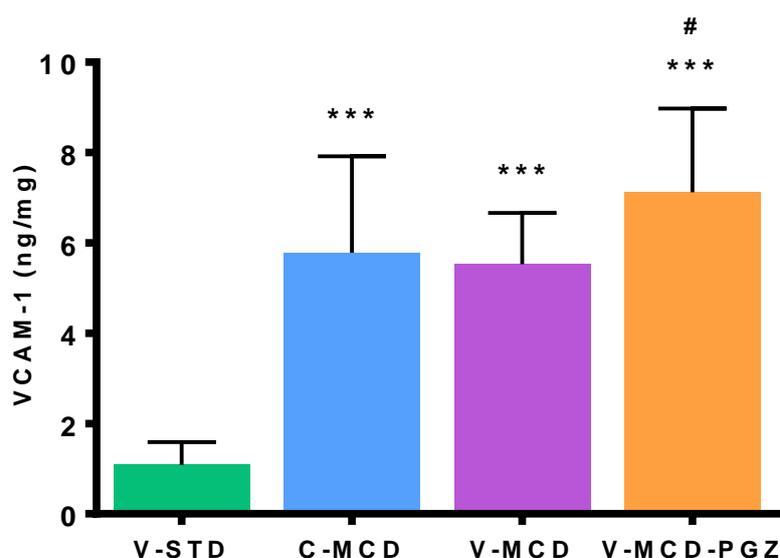


Figure 75 : Dosage de VCAM-1 hépatique par ELISA. (ng de VCAM-1 par mg de protéine). n=9 par groupe. *** : p<0,001 vs. V-STD, # : p<0,05 vs. V-MCD.

2. Évaluation *in vivo* de la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

L'inflammation hépatique a été évaluée *in vivo* en quantifiant la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 par imagerie SPECT, avant régime, 4 semaines et 8 semaines après régime. L'imagerie SPECT permet d'identifier visuellement les variations de captation du traceur au cours du temps (Figure 76).

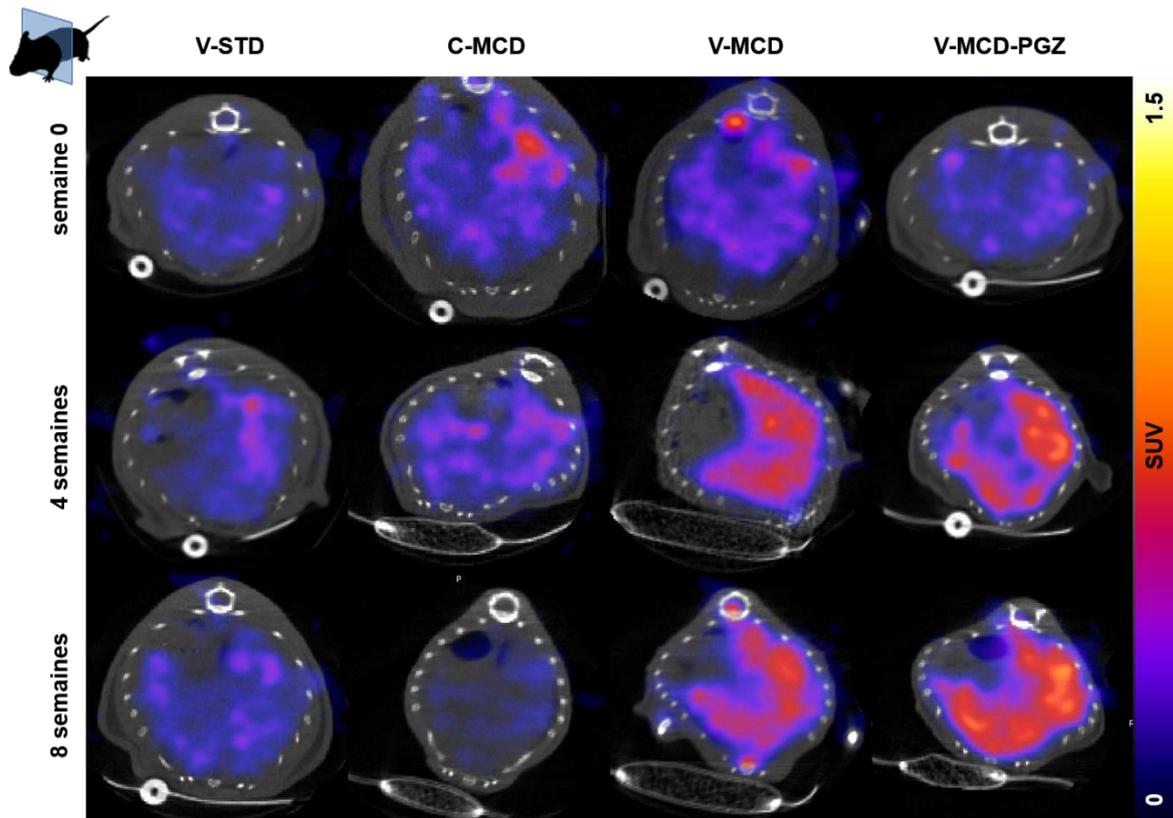


Figure 76 : Imagerie SPECT *in vivo* de la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, 2 h après injection du traceur.

Grâce à l'imagerie CT anatomique il est possible de quantifier précisément l'activité hépatique au cours du temps (Figure 77). À l'état basal la captation est similaire dans les 4 groupes ($0,25 \pm 0,04$, $0,28 \pm 0,04$, $0,26 \pm 0,04$ et $0,25 \pm 0,03$ SUV pour les groupes V-STD, C-MCD, V-MCD et V-MCD-PGZ respectivement). Le régime standard n'entraîne aucune modification de la captation hépatique à 4 ou 8 semaines ($0,25 \pm 0,04$, $0,26 \pm 0,04$ et $0,26 \pm 0,04$ SUV aux temps basaux, 4 semaines et 8 semaines respectivement). Le régime MCD n'entraîne pas de captation non spécifique du traceur au cours du temps, la captation du traceur

contrôle n'étant pas différente à 0, 4 ou 8 semaines ($0,28 \pm 0,04$, $0,27 \pm 0,04$ et $0,21 \pm 0,05$ SUV respectivement).

Après 4 semaines de régime MCD la captation du traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans le groupe V-MCD est deux fois plus importante que celle du nanobody contrôle ($0,48 \pm 0,10$ vs. $0,27 \pm 0,04$ SUV, $p = 0,0002$). La captation du traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans le groupe V-MCD est également doublée entre le temps basal et 4 semaines ($0,48 \pm 0,10$ vs. $0,26 \pm 0,04$ SUV, $p < 0,01$). Toutefois après 8 semaines de régime la captation du traceur n'est pas significativement différente de celle à 4 semaines ($0,48 \pm 0,12$ vs. $0,48 \pm 0,10$ SUV).

Après 4 semaines de régime MCD supplémenté en pioglitazone, la captation du traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans le groupe V-MCD-PGZ est deux fois supérieure à sa captation basale ($0,50 \pm 0,14$ vs. $0,25 \pm 0,03$ SUV, $p < 0,001$). Cette captation est similaire à celle du groupe V-MCD ($0,50 \pm 0,14$ vs. $0,48 \pm 0,10$ SUV). Mais contrairement au groupe V-MCD, la captation du groupe V-MCD-PGZ augmente significativement entre 4 et 8 semaines ($0,61 \pm 0,17$ vs. $0,50 \pm 0,14$ SUV, $p < 0,05$). À 8 semaines toutefois, la captation du groupe V-MCD-PGZ n'est pas significativement plus élevée que celle du groupe V-MCD ($0,61 \pm 0,17$ vs. $0,48 \pm 0,12$ SUV, $p = 0,0696$).

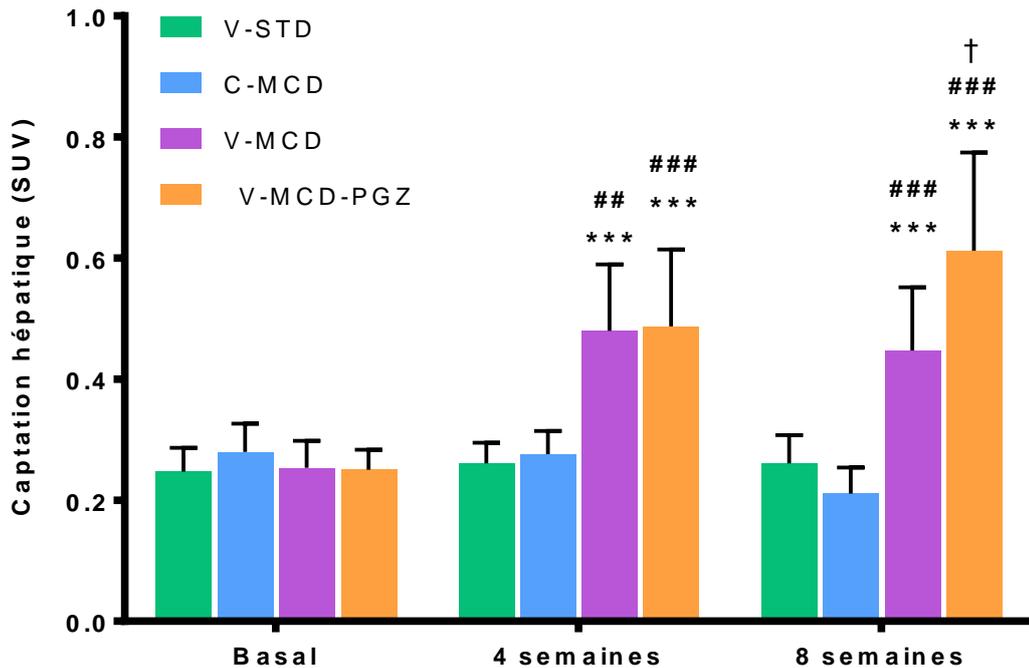


Figure 77 : Quantification de la captation hépatique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$. $n=9$, *** $p<0,001$ vs V-STD. ### $p<0,001$ vs basal. † : $p<0,05$ vs 4 semaines.

La reproductibilité de la mesure de captation du traceur en imagerie SPECT a été évaluée en comparant les valeurs obtenues par 2 expérimentateurs différents (Figure 78). Les expérimentateurs ont tous les deux quantifié la captation hépatique du traceur en utilisant la même technique basée sur le tracé de 3 VOI

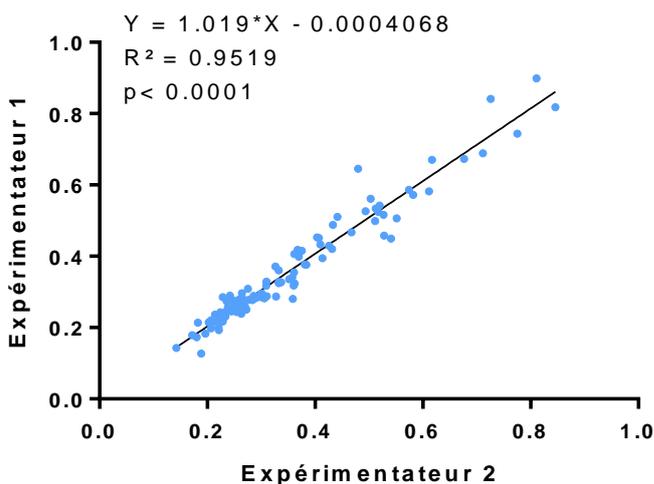


Figure 78 : Corrélation inter-expérimentateur des quantifications de la captation hépatique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$.

dans le foie, délimités grâce à l'imagerie anatomique obtenue avec le CT.

Les résultats ainsi obtenus par les 2 expérimentateurs sont similaires, la corrélation linéaire de ces valeurs est très forte ($R^2 = 0,95$ avec $p < 0,0001$).

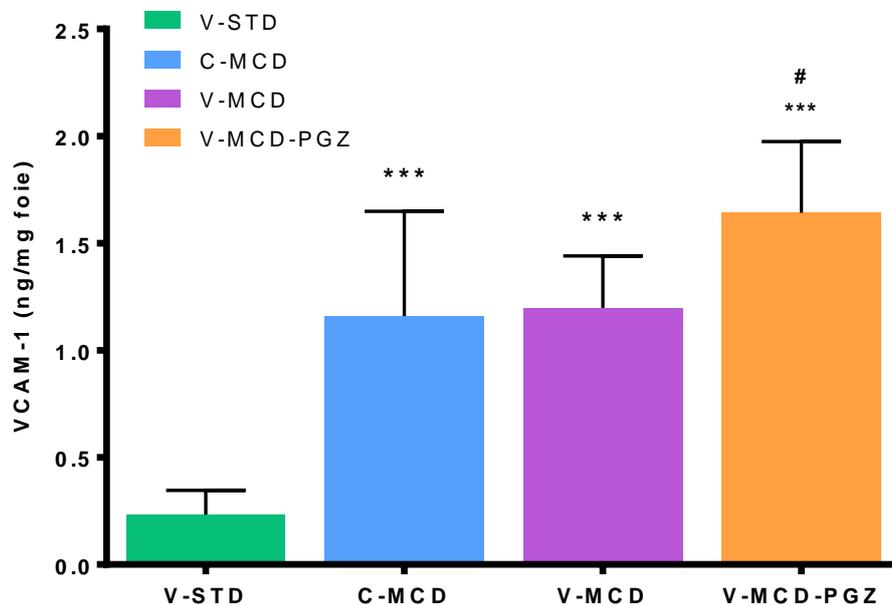
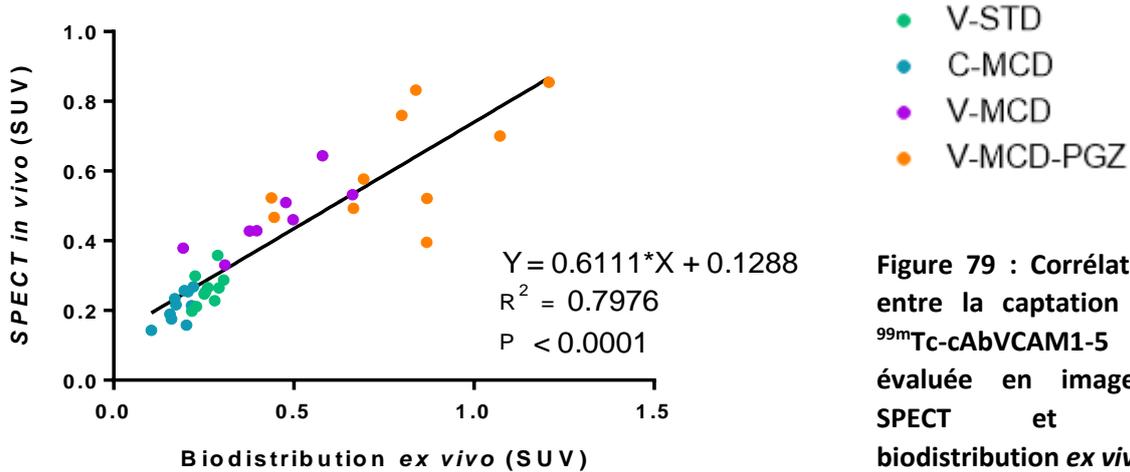
3. Evaluation *ex vivo* de la biodistribution du traceur

À l'issue de la dernière acquisition SPECT/CT, les souris sont euthanasiées par inhalation de CO² et la biodistribution des traceurs a été déterminée *ex vivo* par prélèvements d'organes. On observe une forte captation du traceur ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans les organes lymphoïdes exprimant fortement VCAM-1 (ganglions, moelle osseuse, rate) des souris V-STD, V-MCD et V-MCD-PGZ (captations comprises entre $0,96 \pm 0,43$ et $4,63 \pm 1,89$ SUV). Ces captations sont toujours significativement supérieures à celles observées dans les mêmes organes avec le traceur contrôle (Tableau 11). Dans les autres organes analysés, à l'exception du rein et du foie, la captation du traceur ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 est toujours inférieure à 0,5 SUV, y compris dans le sang. Les souris des groupes V-MCD et V-MCD-PGZ présentent une captation splénique du traceur ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 deux fois plus élevée que les souris sous régime standard ($4,41 \pm 2,11$ et $4,63 \pm 1,89$ SUV pour les groupes V-MCD et V-MCD-PGZ respectivement contre $2,01 \pm 0,36$ pour le groupe V-STD, $p < 0,01$). L'élimination des nanobodies se faisant par voie rénale, on observe une très forte activité dans cet organe, dans les 4 groupes. Ceci est dû à la fois au mode d'élimination du radiotracer mais aussi à une fixation des nanobodies dans le cortex rénal *via* la mégaline (Tchouate Gaïnkam *et al.*, 2011). Les souris du groupe V-MCD ont une activité sanguine significativement plus élevée que les souris sous régime standard ($0,26 \pm 0,13$ vs. $0,11 \pm 0,02$ SUV, $p < 0,01$). Il existe également une tendance à une plus grande captation sanguine du traceur ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 pour les souris V-MCD-PGZ par rapport au groupe sous régime standard.

Biodistribution (SUV)	V-STD	C-MCD	V-MCD	V-MCD PGZ
Foie	0,26 ± 0,03*	0,18 ± 0,03	0,41 ± 0,14*#	0,79 ± 0,25*#†
Sang	0,11 ± 0,02*	0,17 ± 0,04	0,26 ± 0,13#	0,26 ± 0,16
Cœur	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,07
Muscle	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,04
Rate	2,01 ± 0,36*	0,11 ± 0,03	4,41 ± 2,11*#	4,63 ± 1,89*#
Ganglions	0,96 ± 0,43*	0,12 ± 0,05	1,30 ± 0,65*	1,22 ± 0,92*
Moelle osseuse	1,08 ± 0,44*	0,03 ± 0,01	1,18 ± 0,50*	1,23 ± 0,72*
Glande salivaires	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,05	0,15 ± 0,07	0,25 ± 0,11†
Estomac	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,23 ± 0,12
Thyroïde	0,28 ± 0,16	0,39 ± 0,32	0,32 ± 0,20	0,44 ± 0,41
Rein	64,51 ± 7,08	69,94 ± 20,15	54,65 ± 10,47	53,30 ± 11,68

Tableau 11 : Biodistribution des traceurs, évaluée par comptage *post mortem* de la radioactivité. n=10 par groupe, * $p < 0,01$ vs C-MCD, # $p < 0,01$ vs V-STD, † $p < 0,01$ vs V-MCD.

Le groupe V-MCD présente, comme observé en imagerie, une captation hépatique presque deux fois plus élevée que celle du groupe V-STD ($0,42 \pm 0,14$ vs. $0,26 \pm 0,03$, $p < 0,01$). La captation hépatique du groupe V-MCD-PGZ est quant à elle deux fois plus élevée que celle du groupe V-MCD ($0,79 \pm 0,25$ vs. $0,41 \pm 0,14$ SUV, $p < 0,01$). Les quantifications effectuées en imagerie SPECT *in vivo* corrélaient significativement avec celles réalisées *ex vivo* par prélèvements d'organes ($r^2 = 0,70$; $p < 0,001$) (Figure 79).



Le dosage par ELISA du VCAM-1 hépatique a montré des quantités 5 fois supérieures pour les groupes nourris avec un régime MCD (C-MCD, V-MCD, V-MCD-PGZ) par rapport à celles du groupe nourri avec le régime standard ($1,16 \pm 0,49$, $1,20 \pm 0,24$, $1,64 \pm 0,33$ ng/mg respectivement, contre $0,23 \pm 0,11$ ng/mg pour le groupe V-STD, $p < 0,001$). Le groupe traité avec la pioglitazone présente une quantité de VCAM-1 également plus élevée que celle du groupe V-MCD ($1,64 \pm 0,33$ contre $1,20 \pm 0,24$ ng/mg, $p < 0,05$) (Figure 80). L'expression hépatique de VCAM-1 établie en ELISA et la quantification de la captation du traceur ciblant

VCAM-1 réalisée *in vivo* sont significativement corrélées pour les groupes imagés avec cAbVCAM1-5 ($R^2 = 0,43$; $p < 0,001$) (Figure 81). Cette corrélation n'existe pas pour le groupe imagé avec le traceur contrôle.

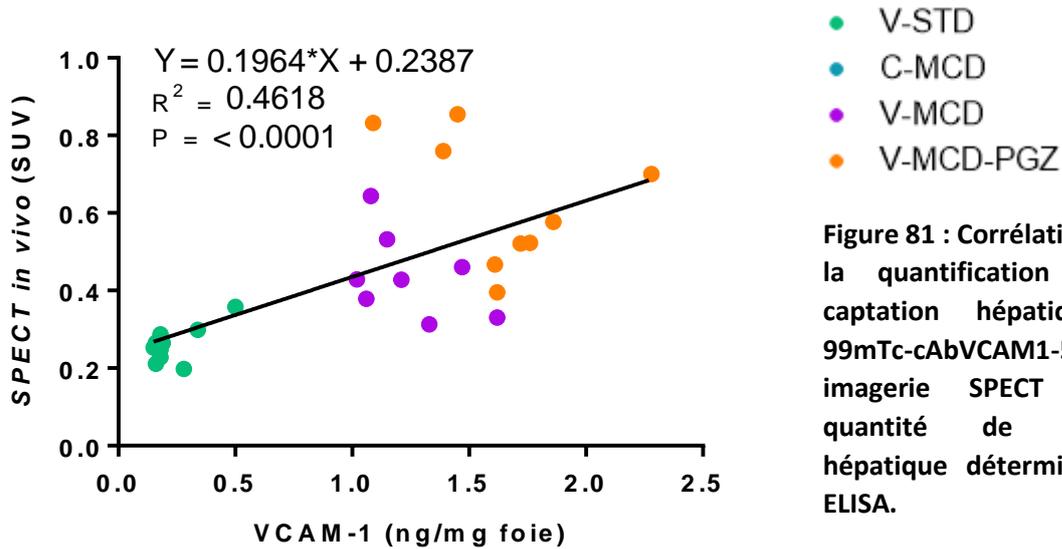


Figure 81 : Corrélation entre la quantification de la captation hépatique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 par imagerie SPECT et la quantité de VCAM-1 hépatique déterminée par ELISA.

La captation du traceur observée en autoradiographie n'a pas mis en évidence d'hétérogénéité de la captation hépatique, que ce soit pour le nanobody contrôle (Figure 82, A), ou pour le nanobody cAbVCAM1-5 dans le groupe V-MCD (Figure 82, B). La captation hépatique de cAbVCAM1-5 est, comme en imagerie et en biodistribution, plus importante que la captation du nanobody contrôle.

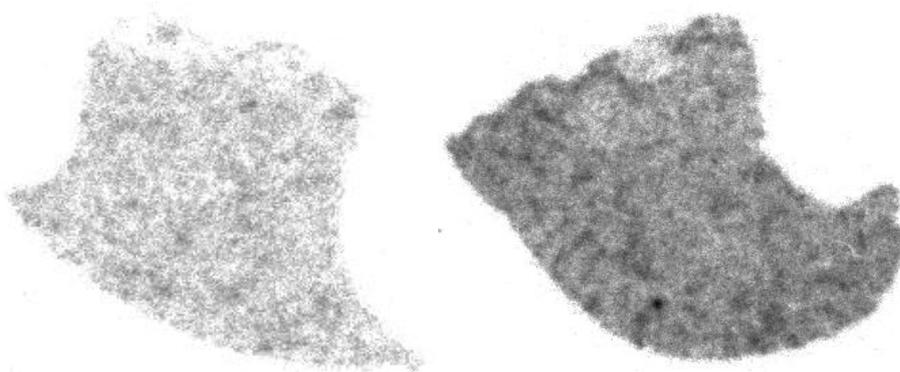


Figure 82 : Autoradiographie de coupes de tissus hépatiques. A : groupe C-MCD, B : groupe V-MCD.

2) Sensibilité de la méthode proposée

1. Caractérisation du modèle

Comme dans la partie précédente de l'étude les souris ont perdu du poids avec le régime MCD. Cette perte de poids apparait au même rythme que précédemment, pour atteindre presque 40% de perte à la fin du protocole. Le groupe Reverse, comme les autres groupes nourris avec le régime MCD, perd rapidement du poids la première semaine, mais le retour au régime standard rétablit rapidement une masse corporelle similaire au groupe contrôle. Ce dernier garde une masse corporelle stable tout au long des 4 semaines de régime (Figure 83).

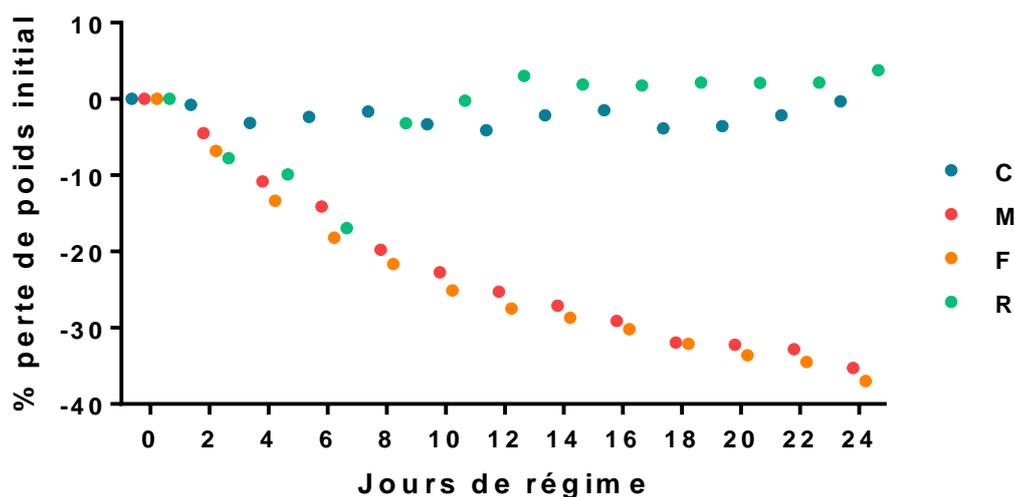


Figure 83 : Suivi de la masse corporelle des souris des différents groupes au cours du régime.
n = 9 par groupe.

Les colorations des coupes à froid avec l'Oil Red O ont montré des niveaux de stéatose différents selon les groupes (Figure 84). De nombreuses vacuoles lipidiques sont visibles dans les groupes M (régime MCD contrôle) et F (régime MCD et agoniste de FXR), au contraire des groupes C (régime standard contrôle) et R (régime MCD réverse) où aucune coloration rouge n'est visible.

Les colorations HES des coupes de tissus fixés en paraffine permettent de mettre en évidence le "mauvais état de santé" du tissu hépatique des souris des groupes M et F comparé aux souris des groupes C et R. Comme précédemment avec la coloration ORO, d'importantes vacuoles lipidiques sont visibles dans les groupes M et F, laissant peu de place aux cellules endémiques du tissu hépatique (Figure 85). La mauvaise qualité du tissu a toutefois posé problème et n'a pas permis l'obtention de coupes de qualité suffisante à une analyse morphologique plus poussée, empêchant notamment d'établir une scorification de l'état de la NASH.

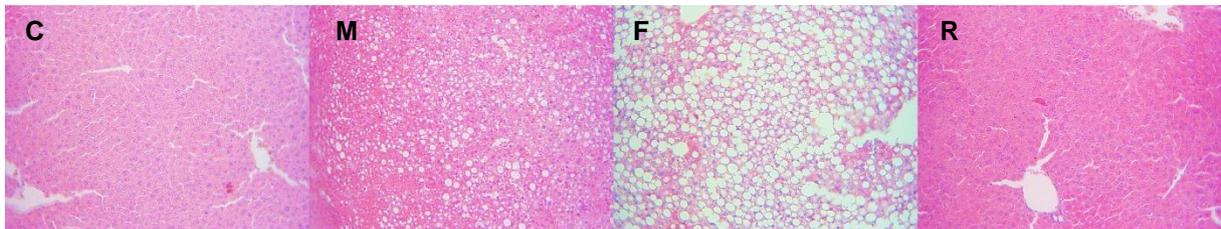


Figure 85 : Observations histologiques de coupes de foie avec une coloration hématoxyline éosine safran. C : groupe régime Contrôle ; M : groupe régime MCD ; F : groupe régime MCD + agoniste de FXR ; R : groupe régime MCD réversé.

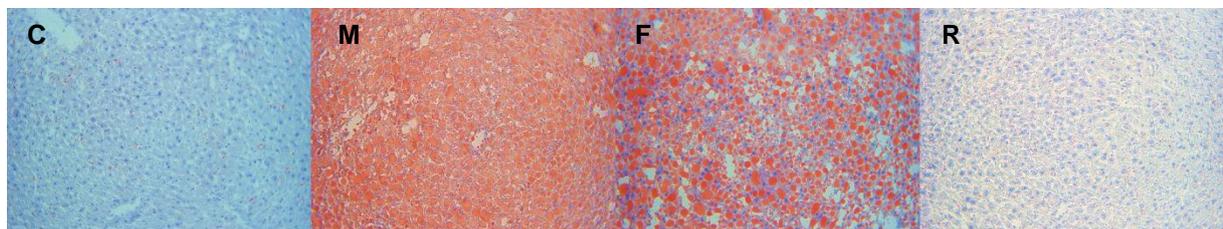


Figure 84 : Observations histologiques de coupes de foie avec une coloration Oil Red O. C : groupe régime Contrôle ; M : groupe régime MCD ; F : groupe régime MCD + agoniste de FXR ; R : groupe régime MCD réversé.

2. Évaluation *in vivo* de la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

L'inflammation hépatique a été évaluée *in vivo* en quantifiant la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 par imagerie SPECT/CT, à 1 et 4 semaines (Figure 86).

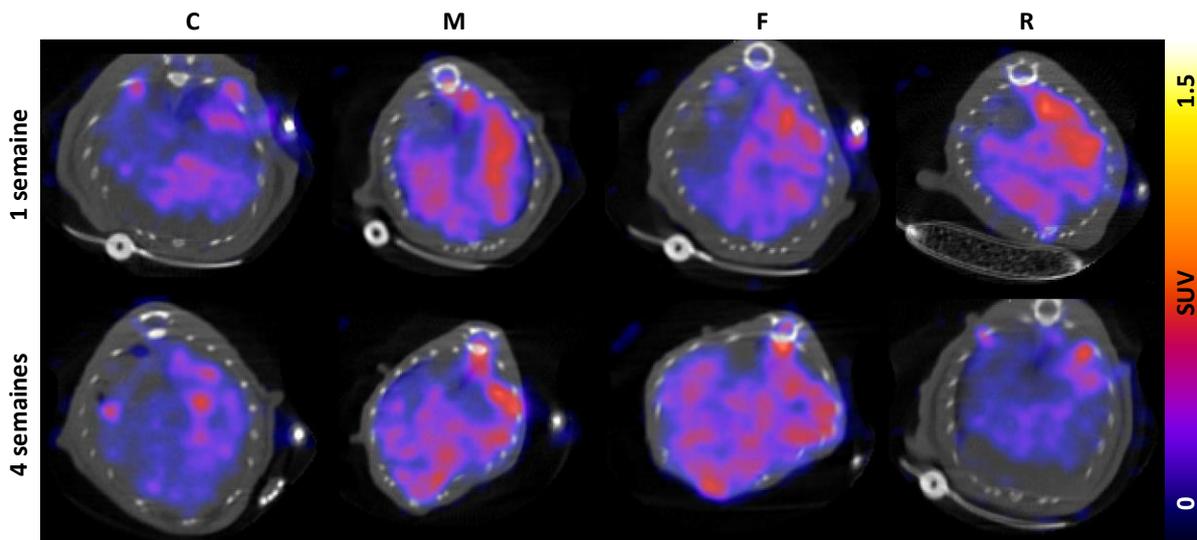


Figure 86 : Imagerie SPECT *in vivo* de la captation hépatique du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, 2 h après injection du traceur.

Comme précédemment, grâce à l'imagerie CT anatomique il est possible de quantifier l'activité hépatique du traceur (Figure 87). Après une semaine de régime MCD, les groupes MCD seul (M), MCD + FXR (F) et Reverse (R) ont une captation hépatique significativement plus élevée que celle du groupe contrôle (C) ($0,30 \pm 0,03$, $0,38 \pm 0,11$ et $0,38 \pm 0,04$ SUV respectivement contre $0,24 \pm 0,20$ SUV pour le groupe C, $p < 0,01$). À 4 semaines, la captation du groupe contrôle reste au niveau de sa valeur initiale ($0,20 \pm 0,03$ SUV), la captation des groupes M et F n'évolue pas non plus, restant ainsi toujours significativement plus élevées que celle du groupe C ($0,36 \pm 0,06$ et $0,35 \pm 0,05$ SUV respectivement, $p < 0,001$). En revanche, la captation hépatique du groupe R diminue significativement par rapport à sa valeur basale ($0,25 \pm 0,04$ contre $0,38 \pm 0,04$ SUV, $p < 0,01$). La captation du groupe

F à 4 semaines est significativement plus faible que celle des groupes M et F ($p < 0,01$).

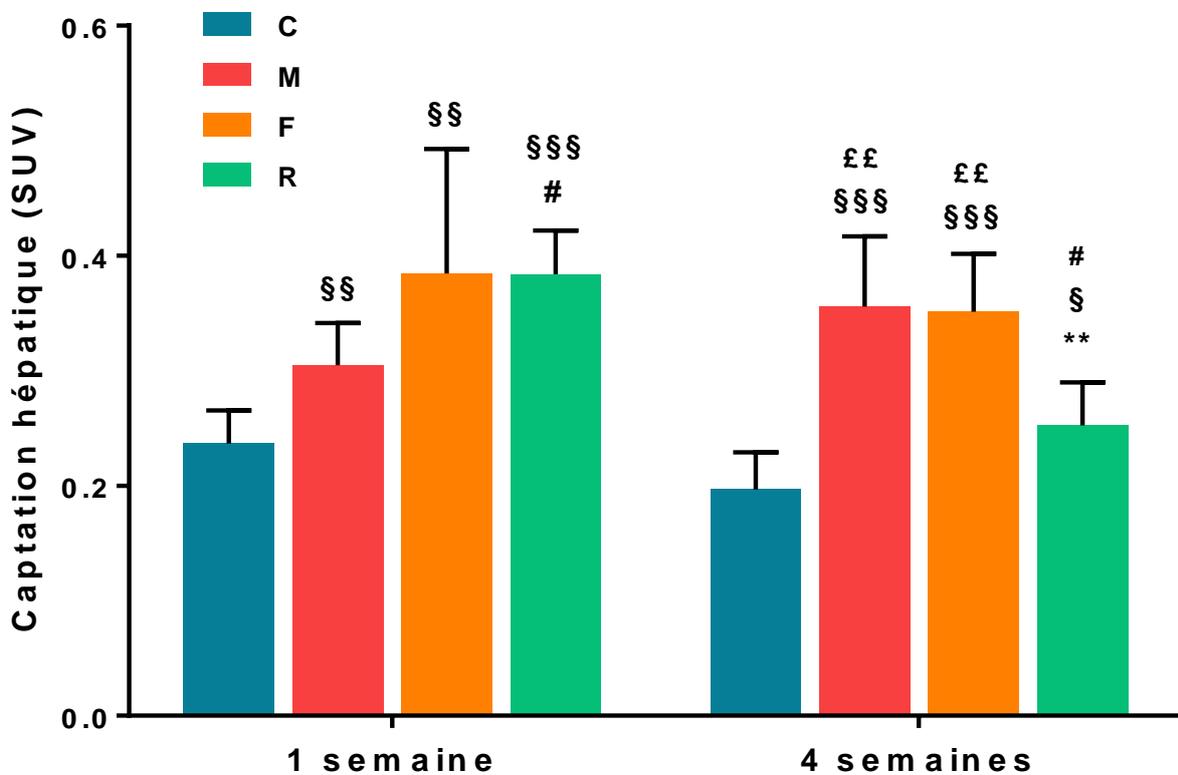


Figure 87 : Quantification en imagerie SPECT de la captation hépatique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$. $n = 9$ par groupes, : * vs. 1 semaine, # vs. MCD, § vs. chow, £ vs. reverse.

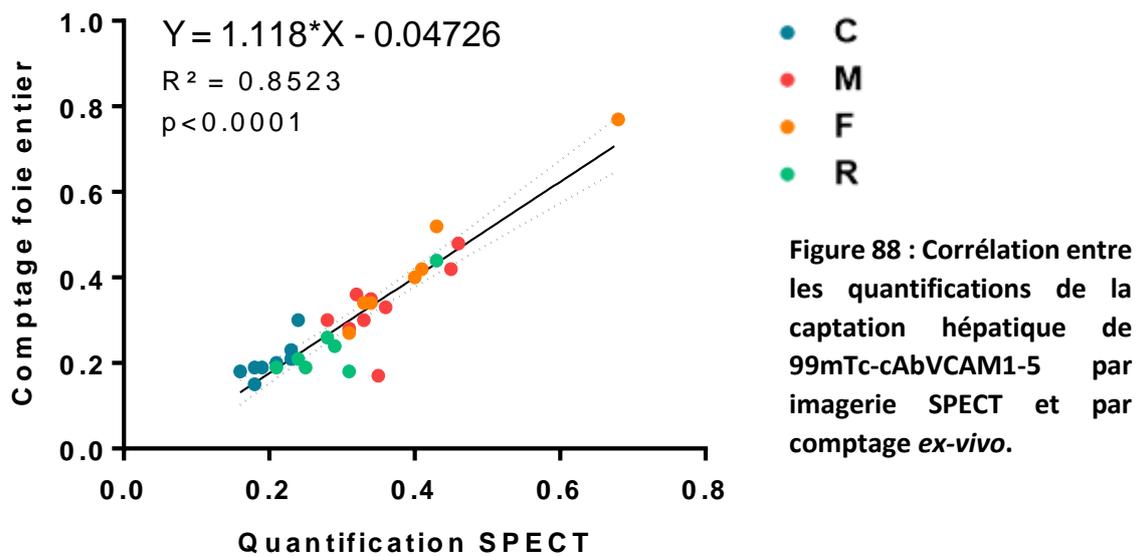
3. Evaluation *ex vivo* de la biodistribution du traceur

À l'issue de l'acquisition SPECT/CT à 4 semaines, les souris sont euthanasiées par inhalation de CO_2 et la biodistribution du traceur cAbVCAM1-5 est déterminée *ex vivo* par prélèvements d'organes (Tableau 12). La biodistribution à 4 semaines (3 semaines de régime MCD pour les groupes M et F) montre des résultats similaires, tout du moins pour les groupes C et M, à ceux obtenus précédemment après 8 semaines de régime. Les organes lymphoïdes des souris nourries avec le régime MCD (M et F) présentent des captations du traceur significativement plus élevées que celle du groupe C, pour la rate et les ganglions, mais pas la moelle osseuse. Les captations dans le cœur, le sang, le muscle et l'estomac sont significativement plus élevées que celles du groupe C.

Biodistribution (SUV)	Régime contrôle (C)	Régime MCD (M)	Agoniste FXR (F)	MCD Réversé (R)
Foie	0,22 ± 0,06	0,39 ± 0,11 ****†	0,38 ± 0,12 **†	0,27 ± 0,04 *
Sang	0,08 ± 0,03	0,16 ± 0,07 **††	0,29 ± 0,19 **†	0,08 ± 0,04
Cœur	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02 **	0,14 ± 0,07 ****††#	0,06 ± 0,02
Muscle	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01 *	0,04 ± 0,01 ****†#	0,02 ± 0,01
Rate	1,33 ± 0,4	2,63 ± 0,69 ****††	4,22 ± 1,24 ****†††##	1,60 ± 0,3
Ganglions	0,51 ± 0,26	0,86 ± 0,25 *	1,27 ± 0,64 *	0,88 ± 0,43 *
Moelle osseuse	0,76 ± 0,35	1,16 ± 0,55	1,25 ± 0,55	1,64 ± 0,67 **
Estomac	0,09 ± 0,03	0,16 ± 0,09 *	0,21 ± 0,08 ****†	0,12 ± 0,04
Thyroïde	0,20 ± 0,1	0,36 ± 0,23	0,33 ± 0,17	0,32 ± 0,3
Rein	61,52 ± 13,62	61,55 ± 11,53	50,43 ± 12,63 ††	66,94 ± 5,32

Tableau 12 : Biodistribution *ex vivo* de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, 3 h après injection. n = 9 par groupe. *, **, *** pour $p < 0,05$; 0,01 ; 0,001 vs. groupe C. †, ††, ††† pour $p < 0,05$; 0,01 ; 0,001 vs. groupe R. #,##,### pour $p < 0,05$; 0,01 ; 0,001 vs. groupe M.

Comme observée en imagerie SPECT, la captation hépatique de cAbVCAM1-5 observée en biodistribution est significativement plus élevée dans les groupes M et F que dans le groupe C ($0,39 \pm 0,11$ et $0,38 \pm 0,12$ SUV respectivement contre $0,22 \pm 0,06$ SUV, $p < 0,001$ et $0,01$ respectivement). Cette même différence se retrouve avec le groupe R ($0,39 \pm 0,11$ et $0,38 \pm 0,12$ SUV contre $0,27 \pm 0,04$ SUV, $p < 0,05$). La captation de cAb-VCAM1-5 du groupe R est quant à elle supérieure à celle du groupe C ($0,27 \pm 0,04$ contre $0,22 \pm 0,06$ SUV, $p < 0,05$). La captation hépatique mesurée *in vivo* par imagerie SPECT corrèle bien avec celle mesurée par prélèvements d'organe ($R^2 = 0,85$, $p < 0,0001$) (Figure 88).



Le dosage de VCAM-1 hépatique par ELISA a montré des quantités de protéines 2 à 3 fois plus importantes dans les groupes M et R que dans le groupe C ($1,53 \pm 0,46$ et $1,63 \pm 0,56$ ng/mg respectivement contre $0,49 \pm 0,14$ ng/mg, $p < 0,0001$). Le groupe F a quant à lui 2 fois plus de VCAM-1 que le groupe C ($0,96 \pm 0,43$ contre $0,49 \pm 0,14$ ng/mg, $p < 0,01$) (Figure 89).

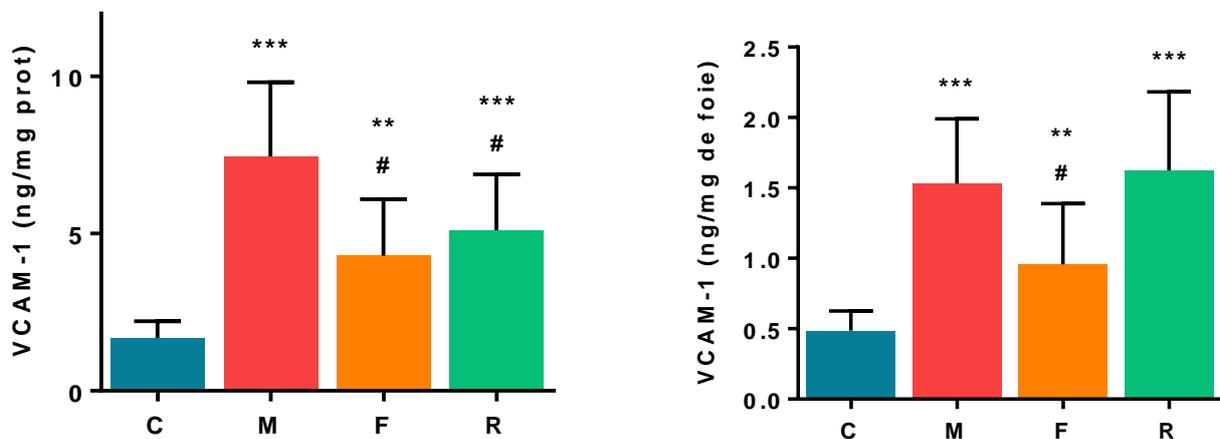


Figure 89 : Quantification par ELISA de VCAM-1 hépatique. Exprimée à gauche en ng/mg de protéines totales, et à droite en ng/mg de foie. *, ** et *** pour $p < 0,05$; $0,01$ et $0,001$ vs. groupe C. # pour $p < 0,05$ vs. M.

Exprimée en ng de VCAM-1 par mg de foie, la quantité de VCAM-1 hépatique dans le groupe R n'est plus significativement différente de celle du groupe M. Les rapports entre les autres groupes ne sont pas modifiés (Figure 89). Si la quantité de VCAM-1 hépatique mesurée par ELISA corrèle significativement

avec la captation du traceur quantifiée *in vivo* en imagerie SPECT ($p = 0,02$) le R^2 est toutefois de seulement 0,15 (contre 0,46 dans la première partie de l'étude) (Figure 90).

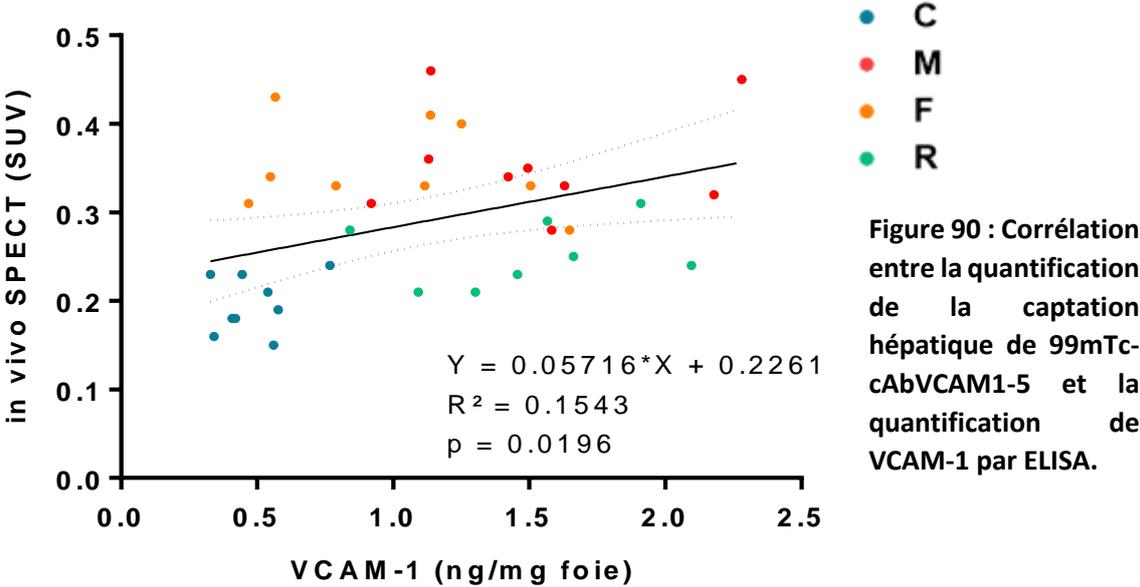


Figure 90 : Corrélation entre la quantification de la captation hépatique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 et la quantification de VCAM-1 par ELISA.

IV. Discussion

Depuis quelques années les stéatohépatopathies, ou NAFLD, sont devenues un vrai problème clinique. Ces pathologies sont considérées comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Partageant ainsi leur étiologie, les NAFLD sont devenues la première cause de maladie chronique du foie. Il est estimé aujourd'hui que 25% de la population mondiale en serait atteint (Younossi *et al.*, 2015). Les NAFLD sont ainsi devenues un vrai problème de santé publique et le manque de traitements et de moyens diagnostiques ont laissé les cliniciens dans le besoin. Pour mieux comprendre la pathogenèse de cette maladie et tenter de répondre à ces besoins, les recherches se sont intensifiées au début des années 2000. C'est ainsi que les résultats annuels de recherche sur le terme "NAFLD", dans les ressources PubMed (NCBI), sont passés de moins de 10 avant 2004 à quasiment 2000 en 2016 (Figure 91).

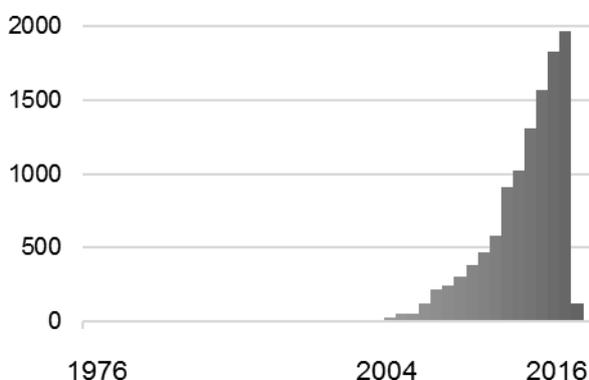


Figure 91 : Nombre de résultats par an pour le terme "NAFLD" dans les ressources PubMed du NCBI.

C'est dans ce contexte que le laboratoire "Radiopharmaceutiques biocliniques", en partenariat avec la société Physiogenex a décidé de s'impliquer dans l'évaluation d'un radiotracer de l'inflammation dans le cadre de la NASH. Ce traceur de l'inflammation, développé au laboratoire, est un nanobody anti VCAM-1, $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$, qui s'est avéré être un très bon marqueur pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables (Broisat *et al.*, 2014, 2012; Dumas *et al.*, 2017). La cible du traceur, VCAM-1, est légitime pour le suivi de l'inflammation dans la NASH, aux vues de son rôle prépondérant dans le développement de l'inflammation tissulaire. De nombreuses études ont montré, qu'aux côtés d'autres acteurs de l'inflammation comme MCP-1 ou TNF- α , VCAM-1 était un marqueur à suivre dans la pathogenèse de la NASH (Ip *et al.*, 2004b; Kudo *et al.*, 2009; Kushikata *et al.*, 2005; Pathil *et al.*, 2012; Yao, 2014; Zhang *et al.*, 2009). De plus son expression est quasi nulle dans le tissu hépatique en

condition physiologique (Adams *et al.*, 1994; Steinhoff *et al.*, 1993). Ainsi la première partie de cette étude consistait en l'évaluation de la faisabilité du transfert de cAbVCAM1-5 dans l'étude de la NASH.

1. *Caractérisation de la méthode*

Le régime MCD est un régime permettant de développer une NASH sur un modèle murin sur une période courte, et de manière reproductible (Machado *et al.*, 2015). S'il n'est pas très représentatif de la pathogenèse humaine, dont il ne reprend pas les caractéristiques liées au syndrome métabolique, ce modèle permet toutefois de reproduire les dommages hépatiques et leur contexte inflammatoire pour cette étude de faisabilité (Ip *et al.*, 2004b, 2004b; Pathil *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009).

Conformément à nos attentes, le régime MCD a permis d'obtenir des dommages hépatiques dès 4 semaines. Ces dommages sont illustrés notamment par l'augmentation de la concentration en ALT plasmatique, pour les groupes ayant reçu le régime MCD. Le développement d'une stéatose marquée a été mise en évidence par l'histologie à 8 semaines grâce à la coloration oil Red O. De plus le marquage en immunohistochimie des macrophages activés a montré qu'ils n'étaient présents que dans les groupes nourris avec le régime MCD. Par ailleurs, la cible, VCAM-1, également témoin de phénomènes inflammatoires, a été dosée par ELISA, et a montré une augmentation dans les groupes nourris avec un régime MCD. L'ensemble de ces données témoignent du développement de la NASH en réponse au régime MCD. Les résultats de dosages d'ALT obtenus lors de cette étude, s'ils présentent des variations cohérentes entre les groupes, présentent toutefois des valeurs brutes faibles par rapport aux valeurs observées habituellement dans la littérature. Ici les groupes ayant reçu un régime MCD présentent à 4 et 8 semaines environ 50 UI/L d'activité ALT, alors que de manière générale, dans la littérature, les valeurs se situent généralement entre 200 et 300 UI/L (Caballero *et al.*, 2010; Ip *et al.*, 2004a; Itagaki *et al.*, 2013; Kawai *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2015). Cette différence est difficilement explicable. Il peut s'agir d'un problème méthodologique, mais les échantillons n'ont pu être redosés par une méthode différente.

Afin d'évaluer la spécificité de la captation du traceur cAbVCAM1-5, il a, dans cette étude, été comparé à un nanobody contrôle. L'analyse de leur captation hépatique à 0, 4 et 8 semaines de régime a permis de montrer une captation spécifique de cAbVCAM1-5. En effet, la captation du traceur a augmenté significativement à 4 et 8 semaines par rapport au temps initial dans le groupe MCD alors qu'elle n'évolue pas, ni dans le groupe injecté avec le traceur contrôle, ni dans le groupe sain. L'absence d'augmentation de la captation du traceur contrôle, malgré l'apparition de la pathologie, suggère l'absence d'une captation non spécifique qui serait liée au développement de la stéatose. La captation de certains traceurs peut être perturbée par une stéatose hépatique importante, le traceur pouvant être retenu dans les vacuoles lipidiques. Certains traceurs basent même leur intérêt sur cette particularité, comme le ^{133}Xe , évoqué plus haut (page 131), hautement liposoluble, et testé comme moyen de détection de la stéatose (Al-Busafi *et al.*, 2012).

Cette partie de l'étude a également permis de valider la méthode de quantification de la captation hépatique du traceur. En effet, ne connaissant pas l'homogénéité de la captation hépatique du traceur il était nécessaire de mettre au point un protocole de quantification reproductible et conforme à la quantification mesurable *ex vivo*. La méthode utilisée a su réunir ces critères en montrant une bonne corrélation entre la quantification en imagerie SPECT et la quantification *ex vivo*. L'autoradiographie et l'observation en 3 dimensions de la captation du traceur n'a pas montré d'hétérogénéité de captation du traceur, simplifiant ainsi l'analyse des images. De plus la méthodologie utilisée, qui repose sur le tracé de 3 zones d'intérêt d'épaisseur fixe à 3 niveaux de coupe prédéfinis, sur l'image anatomique obtenue par CT, s'est avérée très reproductible entre les expérimentateurs. Ainsi cette méthodologie, simple à mettre en pratique, a été validée pour les études à venir.

La biodistribution du traceur est conforme à celles précédemment décrites (Broisat *et al.*, 2014, 2012; Dumas *et al.*, 2017). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5 est capté en grandes quantités dans les organes lymphoïdes et dans les reins, mais très peu dans les autres organes, permettant l'obtention d'un bruit de fond relativement

faible. La captation rénale, et particulièrement corticale, du traceur est due à son mode d'élimination, le traceur non fixé se retrouvant rapidement dans les urines.

Ces résultats ont permis de montrer la faisabilité de la méthode et la spécificité de la fixation hépatique de cAbVCAM1-5 dans un modèle de NASH murin. Toutefois une partie de cette étude était destinée à évaluer la sensibilité de la fixation hépatique de cAbVCAM1-5. Ce groupe était un groupe de souris nourries avec un régime MCD dans lequel était ajouté de la pioglitazone (0,012%). La pioglitazone fait partie de la famille des thiazolidinédiones, des activateurs des PPAR γ , développés pour le traitement du diabète de type 2. Ces activateurs de PPAR γ sont connus pour leurs effets bénéfiques dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique (Blaschke, 2006). C'est la raison pour laquelle différentes études se sont intéressées aux thiazolidinédiones dans le traitement de la NASH. Certaines de ces études ont montré que la pioglitazone permettait, dans un modèle de NASH induite par un régime MCD, de réduire le profil inflammatoire et les dommages hépatiques (Kawai *et al.*, 2012). Un autre effet observé dans la NASH est la relocalisation des acides gras hépatiques vers les adipocytes (Ip *et al.*, 2004b). Toutefois cet effet ne semble pas applicable à un modèle de NASH induit par un régime MCD, les souris perdant beaucoup de masse adipeuse au cours du régime. Malgré ce dernier point et compte tenu des résultats obtenus dans la littérature avec la pioglitazone dans un régime MCD, nous attendions une diminution de l'expression de VCAM-1 dans le groupe V-MCD-PGZ, ainsi qu'une diminution de la captation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5. Or la pioglitazone n'a pas permis de diminuer l'expression de VCAM-1 dans le groupe traité. Au contraire, son expression s'est avérée significativement plus élevée par rapport au groupe de souris V-MCD, les souris atteintes de NASH et non traitées. Parallèlement à l'augmentation de l'expression de VCAM-1 dans le groupe V-MCD-PGZ, la captation hépatique de cAbVCAM1-5 a également augmenté pour ce groupe. Ainsi, comme pour l'expression de VCAM-1, la captation hépatique du traceur est significativement plus élevée dans le groupe V-MCD-PGZ que dans le groupe V-MCD. Si le traitement à la pioglitazone n'a pas eu l'effet escompté, il a tout de même permis de montrer la sensibilité de la captation du traceur cAbVCAM1-5,

puisque sa captation dans le foie est corrélée à l'augmentation de sa cible, VCAM-1.

2. Sensibilité de la méthode proposée

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était la mise au point d'une méthode de diagnostic et de suivi de l'inflammation dans un modèle de NASH murin. Cette méthode pourrait alors être utilisée afin d'évaluer des nouvelles molécules thérapeutiques dans le cadre de cette pathologie. Dans ce cadre il est important de proposer une méthode sensible, utilisable avec un modèle de NASH pouvant se développer rapidement. Ainsi dans cette partie, la durée du régime MCD a été diminuée de 8, à 4 semaines. De plus, suite aux importantes pertes de masse corporelle observées sur 8 semaines de régime, une réduction de la durée du régime est bénéfique pour le bien-être des animaux. Après l'échec de la pioglitazone comme traitement pour réduire le niveau de VCAM-1 dans la NASH induite par régime MCD, une nouvelle molécule a été testée. Il s'agit du Turofexorate Isopropyl, ou WAY-362450, un agoniste de FXR. L'activation des récepteurs FXR est une voie prometteuse dans le traitement de la NASH. WAY-362450 a montré des effets bénéfiques dans le traitement de la NASH dans différents modèles de NASH murins (Evans *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014). L'un de ces effets est une diminution de l'inflammation hépatique, avec notamment une baisse de l'expression de VCAM-1, MCP-1 ou encore TIMP1. Pour toutes ces raisons, WAY-362450 semblait le candidat idéal pour évaluer la sensibilité de la mesure de la captation hépatique de cAbVCAM1-5, en faisant varier l'expression de sa cible VCAM-1. Nous avons décidé de tester également un groupe de souris nourries avec le régime MCD pendant une semaine avant de retourner vers un régime standard pour les trois semaines restantes du protocole. Ce groupe avait pour rôle, comme pour le groupe avec un agoniste de FXR, de faire varier la quantité de VCAM-1 hépatique au cours du temps et donc de tester la sensibilité de la mesure de captation hépatique de cAbVCAM1-5.

L'adjonction d'un traitement, par gavage, le WAY-362450, au régime MCD n'a pas eu d'effet sur la perte de poids des animaux. L'évolution de la masse corporelle des groupes MCD seul (M) et MCD + agoniste de FXR WAY-362450 (F)

est similaire à celle observée dans la première partie de l'étude. Après 24 jours de régime MCD tous les groupes ayant été nourris avec ce régime ont perdu plus de 30% de leur masse corporelle initial. Le groupe avec réversion du régime MCD vers un régime standard (R) a subi une perte de poids rapide lors de la semaine de régime MCD, comme les groupes M et F, mais après le retour à un régime normal le poids du groupe R est rapidement revenu au niveau du groupe contrôle. Les poids des groupes C et R sont ensuite restés stables jusqu'à la fin du protocole.

La captation hépatique du traceur a été évaluée avec la méthodologie établie dans la première partie de l'étude. Après seulement une semaine de régime MCD, les trois groupes ayant reçu le régime présentent une captation du traceur significativement plus élevée que dans le groupe contrôle. Toutefois le groupe M a une captation plus faible que les groupe R et F. Ces variations peuvent s'expliquer par la durée très courte de régime, qui n'a peut-être pas permis de développer la pathologie de manière très reproductible sur l'ensemble des animaux. Les groupes ayant été constitués de façon aléatoire, avant le protocole d'imagerie, ils ne sont pas parfaitement homogènes. Après 4 semaines, la captation dans le groupe contrôle n'a pas évolué par rapport au temps initial. La captation du groupe F n'a pas non plus évolué, et se retrouve au même niveau que celle du groupe M. Ces résultats montrent l'absence d'effet de WAY-362450 sur la captation du traceur. En revanche, la réversion du régime MCD à un régime standard a été efficace. En effet à 4 semaines, soit 3 semaines après un retour à un régime standard, la captation du traceur dans le groupe R a significativement diminué par rapport au temps initial et par rapport au régime MCD. Cette captation n'est cependant pas revenue au niveau du groupe contrôle et reste significativement plus élevée.

En fin de protocole les colorations de coupes histologiques, en HES et Oil Red O, ont montré un tissu plutôt sain pour les groupe C et R alors qu'une importante stéatose était visible dans les groupes M et F. L'absence d'effet de l'agoniste de FXR WAY-362450 sur la stéatose hépatique dans le cadre d'un régime MCD avait déjà été suggéré par Zhang et al. dans l'une des premières études s'intéressant à cette molécule (Zhang *et al.*, 2009). Dans cette étude l'équipe avait démontré que malgré l'absence d'effet de WAY-362450 sur le niveau de

triglycérides hépatiques, le traitement avait eu des effets significatifs sur la réduction des activités ALT et AST, de la fibrose, et de l'inflammation hépatique. L'absence d'effets sur la stéatose hépatique avait été expliquée de manière hypothétique par le blocage de la formation des VLDL due à l'absence de choline, rendant impossible l'export des triglycérides hépatiques vers les tissus périphériques. Lors de notre étude, les analyses *ex vivo* ont malheureusement été limitées, et il ne nous a pas été possible de vérifier certaines caractéristiques du modèle et certains effets du traitement. En effet les analyses histologiques ont été compliquées par une très grande fragilité des tissus hépatiques, rendant impossible les marquages immunohistochimiques. Les analyses biochimiques telles que les dosages ALT, AST plasmatiques ou les dosages de MCP-1 hépatiques sont actuellement en cours de réalisation au sein d'un groupe tiers.

Les dosages de VCAM-1 hépatique ont toutefois pu être réalisés au laboratoire. Comme précédemment l'expression de VCAM-1 dans le groupe MCD est augmentée par rapport au groupe contrôle, correspondant ainsi à la captation du traceur observée en imagerie SPECT. La quantité de VCAM-1 dans les groupes F et R posent toutefois problème dans la mesure où la captation du traceur ne corrèle pas correctement avec la quantité de VCAM-1 dans le foie, surtout quand elle est exprimée en ng/mg de foie. En effet, alors que la captation de cAbVCAM1-5 est plus faible dans le groupe R que dans le groupe M, la quantité de VCAM-1 en ng/mg est identique dans les deux groupes. Cette constatation est surprenante dans la mesure où dans la première partie de l'étude, avec des conditions similaires, les quantités de VCAM-1 corrélaient bien avec la captation du traceur cAbVCAM1-5. Lors de cette deuxième partie, les souris ont été gavées quotidiennement avec de l'huile de de maïs, le véhicule de l'agoniste de FXR, WAY-362450. L'histologie a montré un niveau de stéatose plus élevé dans les groupes de la deuxième partie de l'étude que dans la première, et ce, malgré la durée de régime MCD de 4 semaines au lieu de 8. Il est possible que dans ces conditions la stéatose ait été trop importante et que l'excès de triglycérides dans le tissu ait pu fausser le dosage ELISA de VCAM-1, les triglycérides étant répertoriés parmi les molécules pouvant interférer avec les dosages immunologiques (Schiettecatte *et al.*, 2012).

3. Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer qu'il était possible d'évaluer l'inflammation hépatique, dans un modèle murin de NASH induite par un régime MCD, grâce au traceur cAbVCAM1-5. La captation hépatique du traceur s'est avérée spécifique, comme l'a montré sa comparaison avec un traceur contrôle, cAbBcII10. Après seulement 4 semaines de régime MCD, il a été possible de discriminer, grâce à la captation hépatique de cAbVCAM1-5, un groupe de souris saines, un groupe de souris pathologiques et un groupe de souris en rémission. Les traitements utilisés dans cette étude non pas eu les effets escomptés sur l'expression de VCAM-1, contrairement aux descriptions de la littérature. Il manque à notre étude des données permettant de décrire au mieux certaines caractéristiques histologiques et biochimiques de la NASH dans le modèle que nous avons utilisé. L'obtention future de ces données permettra peut-être d'expliquer le manque d'efficacité de la pioglitazone et de WAY-362450 dans notre étude, ainsi que les incohérences observées dans certains dosages.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est intéressé à la mise au point de techniques permettant le diagnostic et le suivi longitudinal de l'insulinorésistance et de la NASH, de manière non invasive, grâce à l'imagerie nucléaire. Ces pathologies touchent une part importante de la population et l'élaboration de tels outils présente un intérêt majeur, à la fois pour une utilisation clinique mais aussi pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques en recherche préclinique.

Dans la première partie de ce travail l'objectif était de proposer une technique de mesure de l'insulinorésistance grâce à un traceur pur du transport du glucose développé au sein du laboratoire, le ^{123}I -6-déoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG). Ce travail a montré que grâce à ce traceur il était possible de discriminer un groupe de rats sains d'un groupe de rats insulinorésistants grâce à un protocole non invasif en imagerie SPECT. Toutefois la technique semble manquer de précision afin d'évaluer correctement l'évolution de la résistance à l'insuline au cours du temps. Des travaux futurs concernant le traitement des données permettraient d'améliorer la précision de la technique pour une utilisation en recherche préclinique. Parallèlement, un essai clinique de phase II avec le 6DIG est en cours afin de démontrer son intérêt en pratique clinique courante pour le diagnostic de la résistance à l'insuline.

Dans une deuxième partie l'objectif était d'évaluer la capacité de cAbVCAM1-5, un nanobody ciblant VCAM-1 à suivre l'inflammation hépatique lors du développement des stéatohépatopathies. Cette étude a montré que l'évaluation de la captation hépatique de ce traceur en imagerie SPECT permettait de diagnostiquer et de suivre le développement de la pathologie dans un modèle murin de NASH. La captation hépatique du traceur s'est avérée spécifique au développement de l'inflammation et à l'augmentation de l'expression de sa cible, VCAM-1. De plus amples études, impliquant différents modèles de NASH, et notamment des modèles plus proches du développement de la pathologie humaine, permettront de mieux caractériser la captation du traceur et sa capacité à diagnostiquer des stades plus précoces de la maladie.

Références bibliographiques

- Abbasi,F. *et al.* (2004) Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, **53**, 159–164.
- Abbasi,F. *et al.* (1997) Results of a placebo-controlled study of the metabolic effects of the addition of metformin to sulfonylurea-treated patients: evidence for a central role of adipose tissue. *Diabetes Care*, **20**, 1863–1869.
- Abdul-Ghani,M.A. *et al.* (2008) Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *AJP Endocrinol. Metab.*, **295**, E678–E685.
- Abdul-Ghani,M.A. and DeFronzo,R.A. (2008) Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.*, **8**, 173.
- Adams,D.H. *et al.* (1994) Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology*, **19**, 588–594.
- Adams,L.A. *et al.* (2005) The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J. Hepatol.*, **42**, 132–138.
- Adorini,L. *et al.* (2012) Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov. Today*, **17**, 988–997.
- Ahima,R.S. *et al.* (2000) Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems. *Front. Neuroendocrinol.*, **21**, 263–307.
- Ahima,R.S. *et al.* (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**, 250–252.
- Aiysha Thompson,K. (2013) Type 2 Diabetes Mellitus and Glucagon Like Peptide-1 Receptor Signalling. *Clin. Exp. Pharmacol.*, **03**.
- Alberti,K.G.M.M. *et al.* (2009) Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, **120**, 1640–1645.
- Alberto,R. *et al.* (2001) Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in Situ CO Source for the Aqueous Preparation of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2)_3(\text{CO})_3]^+$. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3135–3136.
- Al-Busafi,S.A. *et al.* (2012) The utility of Xenon-133 liver scan in the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **26**, 155–159.
- Alkhoury,N. *et al.* (2009) Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 445–451.
- de Alwis,N.M.W. and Day,C.P. (2008) Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J. Hepatol.*, **48 Suppl 1**, S104-112.
- Amabile,N. *et al.* (2012) Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, **27**, 1873–1880.
- Angulo,P. *et al.* (2007) The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*, **45**, 846–854.
- Argo,C.K. *et al.* (2009) Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.*, **51**, 371–379.
- Aronoff,S. *et al.* (2000) Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care*, **23**, 1605–1611.
- Arrese,M. *et al.* (2016) Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig. Dis. Sci.*, **61**, 1294–1303.

- Auguet, T. *et al.* (2014) Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.*, 221.
- Badran, M. and Laher, J. (2011) Obesity in Arabic-Speaking Countries. *J. Obes.*, **2011**, 1–9.
- Balk, E.M. *et al.* (2015) Combined Diet and Physical Activity Promotion Programs to Prevent Type 2 Diabetes Among Persons at Increased Risk: A Systematic Review for the Community Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.*, **163**, 437.
- Basaranoglu, M. and Ormeci, N. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis, pathogenesis, and management. *Turk. J. Gastroenterol.*, **25**, 127–132.
- Bavu, É. *et al.* (2011) Noninvasive In Vivo Liver Fibrosis Evaluation Using Supersonic Shear Imaging: A Clinical Study on 113 Hepatitis C Virus Patients. *Ultrasound Med. Biol.*, **37**, 1361–1373.
- Bayraktar, M. *et al.* (1996) A comparison of acarbose versus metformin as an adjuvant therapy in sulfonylurea-treated NIDDM patients. *Diabetes Care*, **19**, 252–254.
- Beale, E. *et al.* (2004) Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol. Metab.*, **15**, 129–135.
- Behdad, S. *et al.* (2014) The Effects of Propofol and Isoflurane on Blood Glucose during Abdominal Hysterectomy in Diabetic Patients. *Diabetes Metab. J.*, **38**, 311.
- van der Berg, J.D. *et al.* (2016) Associations of total amount and patterns of sedentary behaviour with type 2 diabetes and the metabolic syndrome: The Maastricht Study. *Diabetologia*, **59**, 709–718.
- Bertoldo, A. *et al.* (2006) Interactions Between Delivery, Transport, and Phosphorylation of Glucose in Governing Uptake Into Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, **55**, 3028–3037.
- Bertoldo, A. *et al.* (2005) 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.*, **90**, 1752–1759.
- Bignan, G. *et al.* (1993) Synthesis of 3-O-(2-iodoethyl)-d-glucose, a stable iodo derivative of d-glucose for medical imaging. *Carbohydr. Res.*, **248**, 371–375.
- Björnholm, M. *et al.* (1997) Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes*, **46**, 524–527.
- Blanc, M.R. *et al.* (2009) A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **54**, 207–212.
- Blaschke, F. (2006) Obesity, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, and Atherosclerosis in Type 2 Diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 28–40.
- Bocarsly, M.E. *et al.* (2010) High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **97**, 101–106.
- Boden, G. *et al.* (2011) Infusion of Glucose and Lipids at Physiological Rates Causes Acute Endoplasmic Reticulum Stress in Rat Liver. *Obesity*, **19**, 1366–1373.
- Boden, G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids: *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, **18**, 139–143.
- Bonadonna, R.C. *et al.* (1996) Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. *Diabetes*, **45**, 915–925.
- Bonadonna, R.C. *et al.* (1993) Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.*, **92**, 486–494.
- Briat, A. *et al.* (2007) In vivo assessment of cardiac insulin resistance by nuclear probes using an iodinated tracer of glucose transport. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **34**, 1756–1764.
- Broisat, A. *et al.* (2014) ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 imaging is a sensitive and reproducible tool for the detection of inflamed atherosclerotic lesions in mice. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, **55**, 1678–1684.
- Broisat, A. *et al.* (2012) Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ. Res.*, **110**, 927–937.

- Browning, J.D. *et al.* (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*, **40**, 1387–1395.
- Buettner, R. (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 485–501.
- Buettner, R. *et al.* (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, **15**, 798–808.
- Caballero, F. *et al.* (2010) Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: Impact on mitochondrial s-adenosyl-l-methionine and GSH. *J. Biol. Chem.*, **285**, jbc.M109.099333.
- Caisse nationale de l'assurance maladie, Paris, France (2011) Risque de cancer de la vessie chez les personnes diabétiques traitées par pioglitazone en France : une étude de cohorte sur les données du SNIIRAM et du PMSI.
- Capeau, J. (2003) Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *médecine/sciences*, **19**, 834–839.
- Cariou, B. *et al.* (2013) Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Agonist GFT505 Improves Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Abdominally Obese Subjects. *Diabetes Care*, **36**, 2923–2930.
- Cariou, B. *et al.* (2011) Effects of the New Dual PPAR / Agonist GFT505 on Lipid and Glucose Homeostasis in Abdominally Obese Patients With Combined Dyslipidemia or Impaired Glucose Metabolism. *Diabetes Care*, **34**, 2008–2014.
- Cariou, B. and Staels, B. (2007) FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 236–243.
- Carmiel-Haggai, M. *et al.* (2005) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.*, **19**, 136–138.
- Cassidy, F.H. *et al.* (2009) Fatty Liver Disease: MR Imaging Techniques for the Detection and Quantification of Liver Steatosis. *RadioGraphics*, **29**, 231–260.
- Cawley, J. and Meyerhoefer, C. (2010) The Medical Care Costs of Obesity: An Instrumental Variables Approach National Bureau of Economic Research.
- Cefalu, W.T. (2008) Diabetic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, **2**, 208–222.
- Chastin, S.F.M. *et al.* (2015) Meta-analysis of the relationship between breaks in sedentary behavior and cardiometabolic health: Breaks in Sedentary Behavior. *Obesity*, **23**, 1800–1810.
- Cheng, A.Y.Y. (2005) Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.*, **172**, 213–226.
- Chiasson, J.-L. *et al.* (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet Lond. Engl.*, **359**, 2072–2077.
- Chiu, M.L. *et al.* (1990) Effect of Mitochondrial and Plasma Membrane Potentials on Accumulation of Hexakis (2-Methoxyisobutylisonitrile)Technetium(I) in Cultured Mouse Fibroblasts. *J. Nucl. Med.*, **31**, 1646–1653.
- Cho, K. *et al.* (2015) Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR α /POMC pathway. *Sci. Rep.*, **5**, 8145.
- Clark, J.B. *et al.* (1983) The diabetic Zucker fatty rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, **173**, 68–75.
- Cobb, J. *et al.* (2013) A novel fasting blood test for insulin resistance and prediabetes. *J. Diabetes Sci. Technol.*, **7**, 100–110.
- Cohen, J.C. *et al.* (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, **332**, 1519–1523.
- Coleman, D.L. (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, **14**, 141–148.
- Cook-Mills, J.M. *et al.* (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1607–1638.

- Coster,A.C.F. *et al.* (2004) Insulin Stimulates the Entry of GLUT4 into the Endosomal Recycling Pathway by a Quantal Mechanism: GLUT4 Trafficking. *Traffic*, **5**, 763–771.
- Csaky,T.Z. and Wilson,J.E. (1956) The fate of 3-O-14CH₃-glucose in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 185–186.
- DeFronzo,R.A. *et al.* (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, **237**, E214.
- DeFronzo,R.A. and Goodman,A.M. (1995) Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 541–549.
- Dills,D.G. *et al.* (1996) Clinical evaluation of glimepiride versus glyburide in NIDDM in a double-blind comparative study. *Horm. Metab. Res.*, **28**, 426–429.
- Dixon,L.J. *et al.* (2013) Kupffer Cells in the Liver. In, Terjung,R. (ed), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Dong,Y.F. *et al.* (2010) Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **53**, 180–191.
- Dowman,J.K. *et al.* (2010) Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, **103**, 71–83.
- Dubuc,P.U. (1976) The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism.*, **25**, 1567–1574.
- Dulai,P.S. *et al.* (2016) MRI and MRE for non-invasive quantitative assessment of hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD and NASH: Clinical trials to clinical practice. *J. Hepatol.*, **65**, 1006–1016.
- Dumas,L.S. *et al.* (2017) Evaluation of anti-atherogenic properties of ezetimibe using 3H-labeled LDL and (99m)Tc-cAbVCAM1-5 SPECT imaging in ApoE^{-/-} mice fed a paigen diet. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*
- Etgen,G.J. and Oldham,B.A. (2000) Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism*, **49**, 684–688.
- Evans,M.J. *et al.* (2009) A synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist promotes cholesterol lowering in models of dyslipidemia. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, **296**, G543–G552.
- Farooqi,I.S. *et al.* (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.*, **110**, 1093–1103.
- Fattovich,G. *et al.* (2004) Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, **127**, S35–S50.
- Feinendegen,L.E. *et al.* (1986) Glucose transport and utilization in the human brain: model using carbon-11 methylglucose and positron emission tomography. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, **27**, 1867–1877.
- Feldstein,A.E., Canbay,A., Guicciardi,M.E., *et al.* (2003) Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J. Hepatol.*, **39**, 978–983.
- Feldstein,A.E. *et al.* (2004) Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, **40**, 185–194.
- Feldstein,A.E., Canbay,A., Angulo,P., *et al.* (2003) Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, **125**, 437–443.
- Ferraioli,G. *et al.* (2012) Reproducibility of real-time shear wave elastography in the evaluation of liver elasticity. *Eur. J. Radiol.*, **81**, 3102–3106.
- Ferwana,M. *et al.* (2013) Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet. Med.*, **30**, 1026–1032.
- Flatt,B. *et al.* (2009) Discovery of XL335 (WAY-362450), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *J. Med. Chem.*, **52**, 904–907.
- Friedman,S.L. (2004) Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **1**, 98–105.
- Frulio,N. and Trillaud,H. (2013) Ultrasound elastography in liver. *Diagn. Interv. Imaging*, **94**, 515–534.
- Fujita,Y. and Inagaki,N. (2014) Renal sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a novel therapeutic approach to treatment of type 2 diabetes: Clinical data and mechanism of action. *J. Diabetes Investig.*, **5**, 265–275.

- Fuster, V. *et al.* (2005) Atherothrombosis and High-Risk Plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **46**, 937–954.
- Gaia, S. *et al.* (2011) Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis. *J. Hepatol.*, **54**, 64–71.
- Gallagher, B.M. *et al.* (1978) Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Nucl. Med.*, **19**, 1154–1161.
- Garvey, W.T. *et al.* (1991) Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1072–1081.
- Gawrieh, S. and Chalasani, N. (2015) Pharmacotherapy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin. Liver Dis.*, **35**, 338–348.
- Goodpaster, B.H. *et al.* (2014) Interactions Among Glucose Delivery, Transport, and Phosphorylation That Underlie Skeletal Muscle Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes: Studies With Dynamic PET Imaging. *Diabetes*, **63**, 1058–1068.
- Graham, D.J. *et al.* (2010) Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *Jama*, **304**, 411–418.
- Griffen, S.C. *et al.* (2001) A genetic defect in β -cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes*, **50**, 63–68.
- Grubb, S.C. *et al.* (2004) A collaborative database of inbred mouse strain characteristics. *Bioinformatics*, **20**, 2857–2859.
- Gualillo, O. *et al.* (2000) Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.*, **67**, 2433–2441.
- Guilherme, A. *et al.* (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 367–377.
- Gutch, M. *et al.* (2015) Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J. Endocrinol. Metab.*, **19**, 160.
- Hamers-Casterman, C. *et al.* (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, **363**, 446–448.
- Hanefeld, M. *et al.* (2000) Rapid and short-acting mealtime insulin secretion with nateglinide controls both prandial and mean glycemia. *Diabetes Care*, **23**, 202–207.
- Hanf, R. *et al.* (2014) The dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist GFT505 exerts anti-diabetic effects in db/db mice without peroxisome proliferator-activated receptor γ -associated adverse cardiac effects. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **11**, 440–447.
- Hanke, S. and Mann, M. (2009) The Phosphotyrosine Interactome of the Insulin Receptor Family and Its Substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 519–534.
- Haque, M.S. *et al.* (1999) Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes*, **48**, 1706–1712.
- Harouni, A.A. *et al.* (2014) Assessment of liver fibrosis using fast strain-encoded MRI driven by inherent cardiac motion: Assessment of Liver Stiffness Using FSENC MRI. *Magn. Reson. Med.*, n/a-n/a.
- Hassan, K. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 12082.
- Hatorp, V. (2002) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide. *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, 471–483.
- He, L. *et al.* (2009) Metformin and Insulin Suppress Hepatic Gluconeogenesis through Phosphorylation of CREB Binding Protein. *Cell*, **137**, 635–646.
- Henri, M. (2011) Obésité et insulino-résistance: étude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [125I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose.
- Henry, C., Koumanov, F., *et al.* (1997) [123I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG): a potential tracer of glucose transport. *Nucl. Med. Biol.*, **24**, 527–534.

- Henry,C., Tanti,J.F., *et al.* (1997) Characterization of 6-deoxy-6-iodo-D-glucose: a potential new tool to assess glucose transport. *Nucl. Med. Biol.*, **24**, 99–104.
- Henry,C. *et al.* (1995) Experimental models, protocols, and reference values for evaluation of iodinated analogues of glucose. *Nucl. Med. Biol.*, **22**, 875–885.
- Herz,M. *et al.* (2003) A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naive patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Ther.*, **25**, 1074–1095.
- Holliger,P. and Hudson,P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1126–1136.
- Holmes,B.F. *et al.* (1999) Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.*, **87**, 1990–1995.
- Home,P.D. *et al.* (2009) Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *The Lancet*, **373**, 2125–2135.
- Hoque,M.E. *et al.* (2014) Prevalence of overweight and obesity among children and adolescents of the Indian subcontinent: a meta-analysis. *Nutr. Rev.*, **72**, 541–550.
- Horber,F.F. *et al.* (1990) Isoflurane and whole body leucine, glucose, and fatty acid metabolism in dogs. *Anesthesiology*, **73**, 82–92.
- Hotta,N. *et al.* (2007) Noninvasive assessment of liver disease—measurement of hepatic fibrosis using tissue strain imaging. *Clin. Imaging*, **31**, 87–92.
- Hu,H.H. and Kan,H.E. (2013) Quantitative proton MR techniques for measuring fat: QUANTITATIVE PROTON MR TECHNIQUES FOR MEASURING FAT. *NMR Biomed.*, **26**, 1609–1629.
- Huang,W. *et al.* (2010) Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes*, **59**, 347–357.
- Hundal,R.S. *et al.* (2000) Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**, 2063–2069.
- Huwart,L. *et al.* (2007) Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with MR Elastography versus Aspartate Aminotransferase-to-Platelet Ratio Index 1. *Radiology*, **245**, 458–466.
- Idilman,I.S. *et al.* (2013) Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology*, **267**, 767–775.
- Insull,W. (2009) The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am. J. Med.*, **122**, S3–S14.
- Ip,E. *et al.* (2004a) Administration of the potent PPAR γ agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*, **39**, 1286–1296.
- Ip,E. *et al.* (2004b) Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatol. Baltim. Md*, **39**, 1286–1296.
- Itagaki,H. *et al.* (2013) Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **6**, 2683–2696.
- Jacob,R.J. *et al.* (1992) Simultaneous insulinlike growth factor I and insulin resistance in obese Zucker rats. *Diabetes*, **41**, 691–697.
- James,D.E. *et al.* (1988) Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*, **333**, 183–185.
- Jump,D.B. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.*, **13**, 155–164.
- Jung,U.J. and Choi,M.-S. (2014) Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 6184–6223.
- Kadowaki,T. and Yamauchi,T. (2005) Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr. Rev.*, **26**, 439–451.
- Kahn,B.B. *et al.* (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, **1**, 15–25.

- Katz,A. *et al.* (2000) Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 2402–2410.
- Kawai,D. *et al.* (2012) Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*, **56**, 912–921.
- Kawano,T. *et al.* (2012) Biophysical and Pharmacological Properties of Glucagon-Like Peptide-1 in Rats Under Isoflurane Anesthesia: *Anesth. Analg.*, **115**, 62–69.
- Kelley,D.E. and Mandarino,L.J. (2000) Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, **49**, 677–683.
- Khan,F. *et al.* (2010) The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **6**, 253–261.
- Kikuchi,M. *et al.* (2009) Utility of quantitative ^{99m}Tc-phytate scintigraphy to diagnose early-stage non-alcoholic steatohepatitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**, 229–236.
- Kim,D.Y. *et al.* (2010) Contrast-enhanced computed tomography for the diagnosis of fatty liver: prospective study with same-day biopsy used as the reference standard. *Eur. Radiol.*, **20**, 359–366.
- Kistler,K.D. *et al.* (2011) Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **106**, 460–468; quiz 469.
- Kleiner,D.E. *et al.* (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, **41**, 1313–1321.
- Kopelman,P.G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*, **404**, 635–643.
- Kornek,M. *et al.* (2012) Circulating Microparticles as Disease-Specific Biomarkers of Severity of Inflammation in Patients With Hepatitis C or Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, **143**, 448–458.
- Koumanov,F. *et al.* (1996) Biological studies of analogues of glucose iodinated in positions 1, 2, or 3. *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 53–60.
- Kretschmer,B.D. *et al.* (2005) Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci.*, **76**, 1553–1573.
- Kudo,H. *et al.* (2009) Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. *Liver Int.*, **29**, 988–996.
- Kushikata,T. *et al.* (2005) Isoflurane increases norepinephrine release in the rat preoptic area and the posterior hypothalamus in vivo and in vitro: Relevance to thermoregulation during anesthesia. *Neuroscience*, **131**, 79–86.
- Langin,D. and Arner,P. (2006) Importance of TNF α and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol. Metab.*, **17**, 314–320.
- Lanthier,N. *et al.* (2011) Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *FASEB J.*, **25**, 4301–4311.
- Lassailly,G. *et al.* (2011) Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity: *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23**, 499–506.
- Lautamäki,R. *et al.* (2005) Rosiglitazone improves myocardial glucose uptake in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease: a 16-week randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes*, **54**, 2787–2794.
- Le,D.S.N.T. *et al.* (2009) Repeatability and reproducibility of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and the tracer dilution technique in a controlled inpatient setting. *Metabolism*, **58**, 304–310.
- Le Roith,D. and Zick,Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, **24**, 588–597.
- Lebovitz,H.E. *et al.* (2001) Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 280–288.
- Lebovitz,H.E. (1999) Type 2 diabetes: an overview. *Clin. Chem.*, **45**, 1339–1345.
- Leclercq,I.A. *et al.* (2002) Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J. Hepatol.*, **37**, 206–213.

- de Lédinghen, V. *et al.* (2012) Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: comparison between M and XL probe of FibroScan®. *J. Hepatol.*, **56**, 833–839.
- Lee, S.S. *et al.* (2010) Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J. Hepatol.*, **52**, 579–585.
- Lee, S.S. (2014) Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 7392.
- Lee, Y.H. *et al.* (2003) c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2896–2902.
- Lehr, S. *et al.* (2012) Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS - Clin. Appl.*, **6**, 91–101.
- Leite, N.C. (2014) Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: From physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 8377.
- Leporq, B. *et al.* (2016) Hepatic fat fraction and visceral adipose tissue fatty acid composition in mice: Quantification with 7.0T MRI: Quantification of Fat and Fatty Acid Composition in Mice with 7.0T MRI. *Magn. Reson. Med.*, **76**, 510–518.
- Li, Z.Z. *et al.* (2009) Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: ROLE OF STEAROYL-CoA DESATURASE. *J. Biol. Chem.*, **284**, 5637–5644.
- Libby, P. *et al.* (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, **473**, 317–325.
- Lieber, C.S. *et al.* (2004) Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 502–509.
- Liu, X. *et al.* (2014) Activation of farnesoid X receptor (FXR) protects against fructose-induced liver steatosis via inflammatory inhibition and ADRP reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 117–123.
- Luedde, T. and Schwabe, R.F. (2011) NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 108–118.
- Machado, M.V. *et al.* (2015) Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLOS ONE*, **10**, e0127991.
- Makishima, M. *et al.* (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, **284**, 1362–1365.
- Malhi, H. *et al.* (2006) Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.*, **281**, 12093–12101.
- Malhi, H. *et al.* (2007) Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*, **56**, 1124–1131.
- Maloney, P.R. *et al.* (2000) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.*, **43**, 2971–2974.
- Marcovina, S. *et al.* (2007) Standardization of Insulin Immunoassays: Report of the American Diabetes Association Workgroup. *Clin. Chem.*, **53**, 711–716.
- Mashir, A. and Dweik, R.A. (2009) Exhaled breath analysis: the new interface between medicine and engineering. *Adv. Powder Technol. Int. J. Soc. Powder Technol. Jpn.*, **20**, 420.
- Masuda, K. *et al.* (2012) Usefulness of Technetium-99 m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of non-alcoholic fatty liver disease: 99mTc-MIBI liver scintigraphy for NAFLD. *Hepatol. Res.*, **42**, 273–279.
- Matsuda, M. and DeFronzo, R.A. (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, **22**, 1462–1470.
- Matthews, D.R. *et al.* (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**, 412–419.
- McCuskey, R.S. *et al.* (2004) Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*, **40**, 386–393.
- McLeod, J.F. (2004) Clinical pharmacokinetics of nateglinide: a rapidly-absorbed, short-acting insulinotropic agent. *Clin. Pharmacokinet.*, **43**, 97–120.
- Meyer, C. *et al.* (1998) Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **102**, 619.

- Mfonkeu, J.B.P. *et al.* (2010) Elevated Cell-Specific Microparticles Are a Biological Marker for Cerebral Dysfunctions in Human Severe Malaria. *PLOS ONE*, **5**, e13415.
- Mlinar, B. *et al.* (2007) Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin. Chim. Acta*, **375**, 20–35.
- Modica, S. *et al.* (2010) Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl. Recept. Signal.*, **8**, e005.
- Moran, L.A. *et al.* (2011) Principles of Biochemistry 5 edition. Pearson, Boston.
- Mudaliar, S. *et al.* (2013) Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, **145**, 574–582.e1.
- Mueckler, M. and Thorens, B. (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.*, **34**, 121–138.
- Muniyappa, R. *et al.* (2007) Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *AJP Endocrinol. Metab.*, **294**, E15–E26.
- Münzberg, H. and Myers, M.G. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.*, **8**, 566–570.
- Muyldermans, S. (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 775–797.
- Muzic, R.F. *et al.* (2011) Analysis of metabolism of 6FDG: a PET glucose transport tracer. *Nucl. Med. Biol.*, **38**, 667–674.
- Nagy, L.E. (2015) The role of innate immunity in alcoholic liver disease. *Alcohol Res. Curr. Rev.*, **37**, 237.
- Nakayama, H. *et al.* (2007) Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*, **56**, 470–475.
- Nauck, M.A. *et al.* (2011) Dapagliflozin Versus Glipizide as Add-on Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Who Have Inadequate Glycemic Control With Metformin: A randomized, 52-week, double-blind, active-controlled noninferiority trial. *Diabetes Care*, **34**, 2015–2022.
- Neal, B. *et al.* (2013) Rationale, design, and baseline characteristics of the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study (CANVAS)—A randomized placebo-controlled trial. *Am. Heart J.*, **166**, 217–223.e11.
- Nissen, S.E. and Wolski, K. (2010) Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. *Arch. Intern. Med.*, **170**.
- Ntambi, J.M. *et al.* (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 11482–11486.
- O'Brien, K.D. *et al.* (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, **92**, 945–951.
- Odegaard, J.I. *et al.* (2007) Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, **447**, 1116–1120.
- Olafsen, T. and Wu, A.M. (2010) Antibody Vectors for Imaging. *Semin. Nucl. Med.*, **40**, 167–181.
- Osborn, L. *et al.* (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, **59**, 1203–1211.
- Osborn, O. and Olefsky, J.M. (2012) The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat. Med.*, **18**, 363–374.
- Palmer, M. (2014) Human Metabolism: Lecture Notes.
- Park, S.H. *et al.* (2006) Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment. *Radiology*, **239**, 105–112.
- Paschke, K.M. *et al.* (2010) Clinical applications of breath testing. *F1000 Med Rep*, **2**, 56.
- Pastors, J.G. *et al.* (2002) The evidence for the effectiveness of medical nutrition therapy in diabetes management. *Diabetes Care*, **25**, 608–613.

- Pathil,A. *et al.* (2012) Ursodeoxycholyly lysophosphatidylethanolamide improves steatosis and inflammation in murine models of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Baltim. Md*, **55**, 1369–1378.
- Pellicciari,R. *et al.* (2002) 6 α -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *J. Med. Chem.*, **45**, 3569–3572.
- Pellicciari,R. *et al.* (2004) Bile Acid Derivatives as Ligands of the Farnesoid X Receptor. Synthesis, Evaluation, and Structure–Activity Relationship of a Series of Body and Side Chain Modified Analogues of Chenodeoxycholic Acid. *J. Med. Chem.*, **47**, 4559–4569.
- Perret,P. *et al.* (2007) 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*, **34**, 734–744.
- Perret,P. *et al.* (2003) Assessment of insulin sensitivity in vivo in control and diabetic mice with a radioactive tracer of glucose transport: [125I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **19**, 306–312.
- Perret,P. *et al.* (2004) Biological studies of radiolabeled glucose analogues iodinated in positions 3, 4 or 6. *Nucl. Med. Biol.*, **31**, 241–250.
- Petersen,K.F. and Shulman,G.I. (2006) New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy. *Obesity*, **14**, 34S–40S.
- Peterson,R.G. *et al.* (1990) Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR J.*, **32**, 16–19.
- Promrat,K. *et al.* (2010) Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, **51**, 121–129.
- Puri,P. *et al.* (2008) Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, **134**, 568–576.
- Rabe,K. *et al.* (2008) Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*, **14**, 741–51.
- Radziuk,J. (2000) Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 4426–4433.
- Ratziu,V. *et al.* (2006) Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.*, **6**.
- Ratziu,V. *et al.* (2016) Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*.
- Riehle,C. and Abel,E.D. (2016) Insulin signaling and heart failure. *Circ. Res.*, **118**, 1151–1169.
- Riser Taylor,S. and Harris,K.B. (2013) The Clinical Efficacy and Safety of Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibitors in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, **33**, 984–999.
- Roden,M. and Shulman,G.I. (1999) Applications of NMR spectroscopy to study muscle glycogen metabolism in man. *Annu. Rev. Med.*, **50**, 277–290.
- Rokugawa,T. *et al.* (2014) Potential of 99m Tc-MIBI SPECT imaging for evaluating non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline-deficient diet in mice. *EJNMMI Res.*, **4**, 1.
- Sahai,A. (2004) Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**, G1035–G1043.
- Sampey,B.P. *et al.* (2011) Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*, **19**, 1109–1117.
- Samuel,V.T. and Shulman,G.I. (2012) Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, **148**, 852–871.
- Sanches,S.C.L. *et al.* (2014) Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *BioMed Res. Int.*
- Sanyal,A.J. *et al.* (2010) Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **362**, 1675–1685.

- Sartipy,P. and Loskutoff,D.J. (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 7265–7270.
- Schiettecatte,J. *et al.* (2012) Interferences in immunoassays. *Adv Immunoass Technol.*
- Shapiro,A. *et al.* (2008) Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **295**, R1370–R1375.
- Shoghi,K.I. *et al.* (2008) Time Course of Alterations in Myocardial Glucose Utilization in the Zucker Diabetic Fatty Rat with Correlation to Gene Expression of Glucose Transporters: A Small-Animal PET Investigation. *J. Nucl. Med.*, **49**, 1320–1327.
- Shubrook,J. *et al.* (2015) Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. *Drug Des. Devel. Ther.*, 5793.
- Shulman,G.I. (2004) Unraveling the Cellular Mechanism of Insulin Resistance in Humans: New Insights from Magnetic Resonance Spectroscopy. *Physiology*, **19**, 183–190.
- Sitia,S. (2010) Speckle tracking echocardiography: A new approach to myocardial function. *World J. Cardiol.*, **2**, 1.
- Slieker,L.J. *et al.* (1992) Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a). *Diabetes*, **41**, 187–193.
- Slimani,L. *et al.* (2002) Modélisation multicompartmentale et stratégies expérimentales pour l'étude du transport du glucose chez le rat insulino-résistant. *C. R. Biol.*, **325**, 529–546.
- Spadiut,O. *et al.* (2014) Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol.*, **32**, 54–60.
- Spring-Robinson,C. *et al.* (2009) Uptake of 18F-Labeled 6-Fluoro-6-Deoxy-D-Glucose by Skeletal Muscle Is Responsive to Insulin Stimulation. *J. Nucl. Med.*, **50**, 912–919.
- Staels,B. *et al.* (2013) Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, **58**, 1941–1952.
- Steinhoff,G. *et al.* (1993) Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *Am. J. Pathol.*, **142**, 481.
- Stenlöf,K. *et al.* (2013) Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes Obes. Metab.*, **15**, 372–382.
- Strable,M.S. and Ntambi,J.M. (2010) Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 199–214.
- Strojek,K. *et al.* (2011) Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with glimepiride: a randomized, 24-week, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes. Metab.*, **13**, 928–938.
- Su,K.-H. *et al.* (2014) Dexamethasone-Induced Insulin Resistance: Kinetic Modeling Using Novel PET Radiopharmaceutical 6-Deoxy-6-[18F]fluoro-d-glucose. *Mol. Imaging Biol.*, **16**, 710–720.
- Summers,S.A. *et al.* (1998) Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5457–5464.
- Tchouate Gainkam,L.O. *et al.* (2011) Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol. Imaging*, **6**, 85–92.
- Tessier,D. *et al.* (1994) Glibenclamide vs gliclazide in type 2 diabetes of the elderly. *Diabet. Med.*, **11**, 974–980.
- Tesz,G.J. *et al.* (2007) Tumor Necrosis Factor (TNF) Stimulates Map4k4 Expression through TNF Receptor 1 Signaling to c-Jun and Activating Transcription Factor 2. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19302–19312.
- The Diabetes Prevention Program Research Group (2012) Long-Term Safety, Tolerability, and Weight Loss Associated With Metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes Care*, **35**, 731–737.

- Tovo, C.V. *et al.* (2015) Noninvasive imaging assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on liver scintigraphy. *World J Gastroenterol*, **21**, 4432–4439.
- Tran, L.T. *et al.* (2009) The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.*, **332**, 145–159.
- Tripathy, D. *et al.* (2015) A Novel Insulin Resistance Index to Monitor Changes in Insulin Sensitivity and Glucose Tolerance: the ACT NOW Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **100**, 1855–1862.
- Tripathy, D. *et al.* (2004) Contribution of insulin-stimulated glucose uptake and basal hepatic insulin sensitivity to surrogate measures of insulin sensitivity. *Diabetes Care*, **27**, 2204–2210.
- Tuccori, M. *et al.* (2016) Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *BMJ*, i1541.
- Uldry, M. and Thorens, B. (2004) The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **447**, 480–489.
- U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture (2015) 2015–2020 Dietary Guidelines - health.gov. *Diet. Guidel.*
- U.S. Food and Drug Administration (2016a) Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: FDA revises labels of SGLT2 inhibitors for diabetes to include warnings about too much acid in the blood and serious urinary tract infections.
- U.S. Food and Drug Administration (2016b) Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: FDA strengthens kidney warnings for diabetes medicines canagliflozin (Invokana, Invokamet) and dapagliflozin (Farxiga, Xigduo XR).
- U.S. Food and Drug Administration (2016c) Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: Interim clinical trial results find increased risk of leg and foot amputations, mostly affecting the toes, with the diabetes medicine canagliflozin (Invokana, Invokamet); FDA to investigate.
- Van den Bergh, A. *et al.* (2007) Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc. Res.*, **77**, 371–379.
- Vasilakou, D. *et al.* (2013) Sodium–Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for Type 2 Diabetes A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, **159**, 262–274.
- Verdam, F.J. *et al.* (2013) Non-alcoholic steatohepatitis: a non-invasive diagnosis by analysis of exhaled breath. *J. Hepatol.*, **58**, 543–548.
- Vollaire (2010) Développement d'une nouvelle technique de mesure de la résistance à l'insuline avec un traceur du transport du glucose, le 125I-6-Déoxy-6-Iodo-D-glucose : étude réalisée chez le rat.
- Wallace, T.M. *et al.* (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, **27**, 1487–1495.
- Wang, D. *et al.* (2006) Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*, **147**, 943–951.
- Watanabe, M. *et al.* (1998) Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**, 243–256.
- Weisberg, S.P. *et al.* (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1796–1808.
- Wu, A.M. and Senter, P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1137–1146.
- Wu, W. *et al.* (2014) Activation of farnesoid X receptor attenuates hepatic injury in a murine model of alcoholic liver disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **443**, 68–73.
- Xu, C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.*, **115**, 2656–2664.
- Xu, L. *et al.* (2015) Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*, **5**, 1563–1579.
- Xu, Z.-J. *et al.* (2010) Characterization of High-Fat, Diet-Induced, Non-alcoholic Steatohepatitis with Fibrosis in Rats. *Dig. Dis. Sci.*, **55**, 931–940.
- Yamauchi, T. *et al.* (2007) Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.*, **13**, 332–339.

- Yang,S.Q. *et al.* (1997) Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 2557–2562.
- Yao,J. (2014) FXR agonist GW4064 alleviates endotoxin-induced hepatic inflammation by repressing macrophage activation. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 14430.
- Yilmaz,Y. (2012) Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment. Pharmacol. Ther.*, n/a-n/a.
- Younk,L.M. *et al.* (2014) The cardiovascular effects of insulin. *Expert Opin. Drug Saf.*, **13**, 955–966.
- Younossi,Z.M. *et al.* (2011) Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 524–530.e1.
- Younossi,Z.M. *et al.* (2015) Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatol. Baltim. Md.*
- Zafra,O. *et al.* (2011) Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in *Camelus dromedarius* with mixtures of catabolic proteins: Nanobodies for biodegradative enzymes. *Environ. Microbiol.*, **13**, 960–974.
- Zavaroni,I. *et al.* (1999) Hyperinsulinemia in a normal population as a predictor of non—insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and coronary heart disease: The barilla factory revisited. *Metabolism*, **48**, 989–994.
- Zerhouni,E.A. *et al.* (1988) Human heart: tagging with MR imaging—a method for noninvasive assessment of myocardial motion. *Radiology*, **169**, 59–63.
- Zhang,S. *et al.* (2009) Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.*, **51**, 380–388.
- Zheng,F. *et al.* (2016) Molecular Imaging with Kupffer Cell-Targeting Nanobodies for Diagnosis and Prognosis in Mouse Models of Liver Pathogenesis. *Mol. Imaging Biol.*
- Zimmerman,B.R. (1997) Sulfonylureas. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **26**, 511–522.
- Zorzano,A. *et al.* (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12358–12363.
- Zucker,T.F. and Zucker,L.M. (1996) Fat accretion and growth in the rat. *Obes. Res.*, **4**, 102–108.
- Zuurbier,C.J. *et al.* (2008) Anesthesia’s Effects on Plasma Glucose and Insulin and Cardiac Hexokinase at Similar Hemodynamics and Without Major Surgical Stress in Fed Rats: *Anesth. Analg.*, **106**, 135–142.